19日本国特許庁(JP)

① 特許出頭公表

@公表特許公報(A)

平1-503438

個公表 平成1年(1989)11月22日

⑤Int. Cl. ⁴ C 12 N 15/00

識別記号 ZNA 庁内整理番号 A - 8717-4B 審查請求 未請求 予備審查請求 未請求

部門(区分) 1(1)

A 61 K 39/39! C 07 K 7/06 CB N-8829-4C Z-8318-4H ×

(全 37 頁)

❷発明の名称.

ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ポリペプチド及び抗体

②特 顧 昭63-503555

6929出 顧昭63(1988)3月29日

每翻訳文提出日 昭63(1988)11月30日

◎国際出願 PCT/US88/00998◎国際公開番号 WO88/07543

動国際公開日 昭63(1988)10月6日

優先権主張 201987年

図1987年3月31日図米園(US)図033,047

⑦発 明 者 エッジングトン トーマス エ

アメリカ合衆国 カリフオルニア州 92037 ラ ジョラ アヴェ

ニド ド ラ プラヤ 2362

の出 顋 人 スクリッ

スクリツプス クリニック ア ンド リサーチ フアウンデー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ノース

トーリー パインス ロード 10666

ション

四代 理 人 弁理士 中村

稔 外8名

創指 定 国

AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB

(広域特許),1T(広域特許),JP,LU(広域特許),NL(広域特許),NO,SE(広域特許)

最終頁に続く

浄春(内容に変更なし) 精 求 の 範 囲

- (1) ヒトの組織因子重領タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わずか約12.000スクレオチド塩基対を含む DNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残器で 表わされるアミノ放残器配列を有するタンパク質をコードする、 請求の範囲(1) 記載のDNA断片。
- (3) 上記構造遺伝子が、第2回の、約130春から約918春の 塩巻で表わされるヌクレオチド塩巻配列を有する、請求の疑題 (2)記載のDNA断片。
- (4)上記標设遺伝子が、第1回の約1号から約219号の表表で 変わされるアミノ酸残器配列を有する可容性とト組織因子重額 タンパク質をコードする、辨求の範囲(1)記載のDNA筋片。
- (5) 上記精造遺伝子が、第2回の、約130季から約786番の 塩基で変わされるヌクレオチド塩基配列を有する、精求の観囲 (4)配盤のDNA筋片。
- (6) 上記第1の配列の5、末端に連続し、かつ上記タンパク質の アミノ末端に結合した、アミノ酸残器リーダ配列をコードする 第2の配列も含み、かつ核第1及び第2のDNA配列がヒト組 機因子重慎的監体タンパク質をコードする選点構造遺伝子を定 着する、構成の範囲(1)配数のDNA既片。
- (7) 上記進成構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残 基で表わされるアミノ酸残器配列を有するタンパク質をコード する、検求の範囲(6)記載のDNA断片。
- (8) 上記復成構造遺伝子が、第2図の約34巻から約918巻の 塩蓋で表わされるヌクレオチド塩益配列を有する、請求の疑題 (7)記載のDNA断片。

- (9) 上記法成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約219番の残器で表わされるアミノ放残器配列を有する、可溶性にト組織因子登録タンパク質的駆体をコードする、静水の範囲(6)記載のDNA断片。
- (10)上記提成構造遺伝子が、第2回の約34番から約786番の 塩益で表わされるメクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (9)配数のDNA断片。
- (11) ヒト組織因子章領タンパク質をコードする精造遺伝子を定義 する第1のDNA所片に機能的に結合したベクターを含む組換 丸DNA分子。
- (12)上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残るで 支わされるアミノ政役益配列を有するタンパク賞をコードする、 輸水の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (14) さらに、上記第1の断片の5 * 宋塘に連続し、かつ上記タンパク質に結合した、アミノ酸残基リーダー配列をコードし、かつ該第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする提成構造遺伝子を定義する、請求の範囲(11)配職の組物メDNA分子。
- (15)上記混成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約263番の残蓄で表わされるアミノ散残蓄配列に対応するアミノ散残蓄配列に対応するアミノ散残蓄 配列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、辨求の 範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (16)上記視成構造遺伝子が、第2図の約34番から約918番の 塩苦で扱わされるヌクレオチド塩基配列に対応するヌクレオチ

P塩基配列を有する、請求の範囲(15)記載の組換えDNA分子。

- (17)上記ペクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を指揮 しうる、跨球の経暦(11)記載の組換えDNA分子。
- (18)上記ベクターが、在主知的中、上記タンパク質を発現しうる、 静水の範囲([1])記載の組換えDNA分子。
- (19)上記ベクターが、有主細胞中、上記貯原体タンパク質を発現 しうる、緯次の範囲(14)記載の経済えDNA分子。
- (20)上記ベクターが、p K S V 1 0 であり、かつ、上記還成構造遺伝子が、可容型の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、第2 図の34 番から786番の塩器で変わされるスクレオチド配列を有する、確求の範囲(19)記載の組換え D N A 分子。
- (21)わずか約50アミノ放残器を含み、かつ、

- TREPUTTVOIST -.

- FAAMK2222EKKI -

からなる群から選ばれた式で表わされる配列に対応するアミノ 酸残器を含む、ヒト組織因子結合部位ペプチド類似物。

(22)上記ポリペプチドが、式:

H - VNEVYTVEIST - OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(23)上記ポリペプチドが、式:

B-LYYWXSSSSEKKI-OK

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(24)

からなる野から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位 ポリペプチド類似物。

- (28)上記抗体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、諸 攻の範囲(26)記載の抗体組成物。
- .(29) ヒト超級因子重数タンパク質及び第1図の26番から49番の残器で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する 流体分子を産生する、TP8-5G9と命名されたハイブリドーマ。
- (30) 請求の範囲(29) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (31) ヒト組織因子重領タンパク質及び、第1回の第26番から第 49番の残酷で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-10H10と命名された、 ハイブリドーマ。
- (32) 請求の顧問(31) 記載のハイプリドーマにより産生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (33) ヒト組織因子重額及び、第1図の第146番から第167番で示される式で変わされるポリベプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TP9-6B4と命名した、ハイブリドーマ。
- (34) 請求の範囲(33) 記載のハイブリドーマにより遺生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (35)a)身体サンブルを、ヒト組織因子重領タンパク質と混合し、 免疫反応混合物を作る;
 - b)この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織 因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な時 間維持する、そして、

c)ステップb) で生成した免疫反応産物の存在を検定する、 以上、a) - c) のステップを含む、体液サンプル中のヒト組 機因子素質タンパク質の存在を検定する方法。 (25)

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位 ポリペプチド領位物。

- (26)a)ヒト組織因子意鎮タンパク質と免疫反応し、
 - b)

からなる群から選ばれた式で変わされるポリペプチドと免 疫反応し、かつ

- c) 第1図の第204番から第226番の部位で示される式 で表わされるポリペプチドと実質的に免疫反応しない、 抗体分子を含む、抗体組成物。
- (27)上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲(26)記載の組成物。
- (36)a)生理学的に許容しうる希釈利及び、血柱中に存在するヒト 組織因子と効率よく免疫反応する、生体内指示手段と結合 した、ハイブリドーマTF9-10B10によって産生される、ある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物 を被検者に診験投与する;
 - b)上記投与を受けた被検者を、上記抗体分子が、血栓の一部 として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、免疫反応 度物を形成するのに十分な、予め決められた時間維持する; そして、

c)ステップb) で生成した免疫反応重物の存在を検定する、以上、a) ~ c) のステップを含む生体内の血栓を検出する方法。

- (87) 存在するとト組織因子と効率よく結合する、TF8-5G9 及びTF9-6B4からなる群から選らんだハイブリドーマに よって魔生される、ある量の抗体分子を含有する生理学的に許 容される特釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検体 に誹験投与することを含む、生体内におけるとト組織因子の凝 血因子リン(III a への結合能を中和する方法。
- (38)組成物中、因子14/14』と効率的に結合する量の、

からなる群から選ばれたポリペプチドを、含有する生理学的に 許容された特別刑を含むポリペプチド組成物を被検者に静原投 与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝血因子な ノVIsのの結合を風害する方法。

(39) a) 鏡求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージ

を含むサンプル中に存在すると) 組織因子質額タンパク質の存在を検定するための、キットの形をした診断システム。

- (40)上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、
 - a) TF8-5G9.
 - b) TF9-6B4.
 - c) TF9-10H10

からなる耳から遠ばれたハイブリドーマにより産生される、請求の範囲(39)記載の鉢断システム。

- (41)ョ)サンプルを、固体マトリックスに固定した、請求の範囲 (15)記載のポリペプチドを含む固体サポートと混合し、結合反応混合物とする。
 - b)上記結合反応混合物を、上記器血因子が上記ポリペプチ ドと結合し、固相複合体及び上滑を形成するのに十分な時間維持する。
 - c) 上記復合体から上記上清を分離する、及び
 - 4) ステップ c) の分離した複合体から、上記森血因子を回。 のする

以上、a)~d)のステップを含む、サンプルから血液憂菌因子をプレスを単離する方法。

- (42)実質的に、ヒト組織因子軽度タンパク質を含まない生理学的 活性のあるヒト組織因子重質タンパク質の水溶液を含む組成物。
- (43)上記生物学的活性のあるヒト組織因子重領タンパク賞を、リン庭賞中に分散させた、請求の範囲(42)記載の組成物。
- (44)上記容板が、非イオン性界面密性剤を含む、請求の範囲(42) 記載の組成物。
- (45)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から 第219番の部位で表わされるアミノ放残差配列を有する、論

(47)上記重額タンパク質がリン脂質中に分散している、諸求の範囲(46)記載の診断システム。

(45)a)少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒ

を含む血管システム液体サンプル中での凝固能を検定するキッ

ト組織因子軽額タンパク質を含まない、生物学的活性のある ヒト組織因子重額タンパク質の水溶液を含有する超成物を含

求の範囲(42)記載の組成物。

トの形をした診断システム。

- (48)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1者から 第219巻の部位で表わされるアミノ酸残益配列を有する、請求の範囲(46)記載の診断システム。
- (49) a) とト組織因子貢献タンパク賞をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク賞に結合する、アミノ設務器リーダー配列をコードする第2のDNA断片で、数第1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前額体をコードする混成構造遺伝子を定しているDNA断片と機能的に結合する、ホ乳類細胞に適合する発現ベクターを含む組織えDNA分子でトランスホームしたホ乳質細胞の栄養培地での培養を開始する;
 - b)上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そして
- c)上記培養物から、上記成熟タンパク賞を回収する、 以上、a)~c)のステップを含む、成熟ヒト組織因子重質タンパク質の限製方法。
- (50)上記復成構造遺伝子が、第2図の第34番から第786番の 塩基で表わされるヌクレオチド塩券配列を有する、請求の範囲 (49)記載の方法。
- (51) 請求の範囲(49)記載の方法により産生した、成熟ヒト組織因子重領タンパク質を基本的に合む組成物。
- (52) 請求の範囲(50) 記載の方法により産生した成熟にト組織因子 賃賃タンパク質を基本的に含む組成物。
- (53)ハイブリドーマTFB-5G9により産生される抗体分子を、 投与時間内に存在するとト組織因子と効率よく結合できる量合 有する、生理学的に許容された希釈剤を含む、モノクローナル 抗体組成物を、被検者に静原投与することを含む、ヒト組織因 子の、森血関始能を中和する方法。
- (54) ヒト組織因子重領タンパク質及び、第1回の第26番から第 49番の残器で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を廃生する、TF9-5B7と命名されたハイブリドーマ。
- (55)請求の範囲(54)記載のハイブリドーマにより産生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (56)ハイブリドーマTF9-5B7により産生される抗体分子を 合有する生理学的に許容された希釈剤を含む治療に効果的な量 のモノクローナル抗体組成物を、被検管に投与することを含む、 ヒト組織因子の凝血開始能を中和する方法。
- (57)a)とト組織因子重額タンパク質と免疫反応し、それにより、 該タンパク質の因子MI/MIaへの結合能を阻害し、かつ
 - b) Au TFA: VI/VI = 複合体と免疫反応し、それにより、 嫁複合体の因子X活性化能を阻害する抗体分子を含む治療 的に効果的量の、抗器血モノクローナル抗体組成物を投与

することを含む嶺血を駆害する方法。

(58)上記抗体分子がさらに、ヒヒ組織因子と免疫反応を起こすことを特徴とする、環次の範囲(57)記載の方法。

浄春(内容に変更なし) 明 相 書

ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ ポリペプチド及び抗体

(本出願の関連文献)

本出版は、1987年3月31日に出題された米国出頭第033.047号及び1987年6月25日に出題された出題第067.108号の部分線練出題である。

(技術分野)

本発明は、ヒトの組織因子重額タンパク質(huTFh)をコードする構造遺伝子を有する組換え DNA分子(r DNA)に関し、より詳細には、本発明は、宿主物酸中に含まれる、huJFhを発現しつる発現ペクターに関するものである。また、本発明はhuTPhの合成ポリペプチド類似物及びhuTFh及び資ポリペプチド類似物と結合するモノクローナル抗体に関する。

(発明の背景)

凝血は、一坪の森集因子として知られる細胞性及び血器性タンパク質によって仲介される、一連の、酵素、共因子、タンパク質分解及びゲル化反応のカスケードによって起こる。このカスケードの開始は、観機因子(TP)として知られる細胞性レセプターが、森魚因子可又はその誘導体、因子可≥と結合し、触媒的に活性のある複合体を形成したときに起こる。TFの非存在下、及び複合体への連続する結合がない場合には、個/切≥は凝集を開始しない。従って、TFの化学的かつ生化学的特性が、凝集のメカニズムを理解する上で重要なことは明白である。

組織因子は、通常循環器中で可線化しておらず、また、因子W ノビュ及び他の凝集因子を含む血酸タンパク質と接触できないこ とが分っている、離に結合した練タンパク質である。組織因子は

混合物の界面活性利及びイオン組成に影響されると報告されている。ネマーソン(Nemeraon), ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. lavest.) 4 7 ~ 7 2頁(1958); ネマーソン(Nemeraon), ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. Invest.) 4 8 ~ 3 2 2頁(1969 年); 及びカーソン(Carson)等、サイエンス(Science) 、 2 0 8 巻、3 0 7頁(1980年) 参照。

単離した、もしくは、再動質化したTF含有タンパク質調製物は、数キの類の組織から協出物によって調製した。組織因子は、 天然の組織中に非常に少量しか存在しないので、歴史的に使用されてきた方法は、困難で、時間もかかり、かつ低収率であった。 古典的方法のレヴューとしては、ネマーソン(Nemerson) 等の報告(プログレス・イン・ヘマトシス・アンド・トロンポシス (Pros. Res. Thros.) 6巻、237~261頁(1982年) を報度せよ。

最近、ブローズ(Broze)等(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Ches.)260巻、10917~20(1985年))ボム(Bon)等(トロンボ・リサーチ(Throab. Res.)42巻、635~643頁(1986年)及びグハ(Guha)等(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Hati. Acad. Sci.)USA83巻、293~302頁(1986年))は、脱脂質化組織因子タンパク質を、非イオン性界面活性剤及びCaCe。を含む水溶性溶液に溶かした時、筋タンパク質が因子リノVIaと結合するという発見に基づいた方法を用いて、ヒトの組織因子(buff)タンパク質を早離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を早離したことを報告して、因子VI/Vii類和性吸着体を用いる。これ

通常、血管を形成している細胞の表面上には発現されていないが、血管中の単球によるその発現は、バクテリアのリポ多様のような感染性試解成分、ある抗原により対数されたTヘルペー細胞由来のリンホカイン及び免疫複合体によって誘導することができる。例えばバクテリアのリポ多様同様、インターロイキン1及び護路場死因子アルファのような単細胞/マクロファージのある炎症仲介物は血球の体液例表面にTFを発現する内皮細胞を刺激することができる。 典型的に、血管要素におけるTFの発現は、拡大する血管内凝血又は、局部的な凝血の開始、すなわち血性形成を起こす。

組織因子は、試験皆内の繊維芽細胞を含む培養物中のある血管 外細胞、未同定型の精細胞及び循底膜パリヤーにより、循環する 血質タンパク質から分離されている上皮細胞の表面上に構成的に 免現される。これら細胞上のTFの存在は、組織損傷の結果とし ての血液との接触でクロットを形成する。従って、TFは、森血 システムが開始する基礎である。

ハウウェル(Bowell) (アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー(As. J. Physiol.) 31 地1 頁(1312年))の報告は、アドを合む単関した超微タンパク質調整物は、リン脂質ークンパク質(リポタンパク質) 複合体として存在するときのみ類無を促進することができることを示す最初の報告である。典型的に、アド合有組織タンパク質の単離が、通常アアタンパク質と会しているリン脂質を除去してしまうので、単離したタンパク質を再脂質化することによるアドの複能的プロコアグラント活性の再構成が必要であることから、これら再構成の研究が多くの研究者によって行なわれてきている。例えば、番集活性の回復は、リン脂質のタイプ、タンパク質に対するリン脂質の比、及び再構成

ら方法の使用は、有意量の単階W/Wsを入手することの困難性 のみならず、因子W/Wsの不安定性によっても制限される。

(本発明の概要)

1 つの 監機において、本発明は、ヒトの組織因子重領(huTFb) タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わず か約12.000塩基対を含む DNA断片を考案している。 数構造 遺伝子が、第1図の約1番から約283番で示されているアミノ 数残益を有するタンパク質をコードしていることが好きしい。 さ らに、数構造遺伝子は、第2図の約130番から、約918番で 示されるスクレオチド塩基配列を有することが好ましい。

望ましい粒操においては、そのDNA断片は、第1の配列の5、末端と連続し、かつ、huTFhタンパク質のTミノ末端に結合したTミノ放残器リーダー配列をコードする第2の配列をも含む。その第1及び第2のDNA配列は一緒になって、ヒトの組織因子重鎖前額体(プレhuTFh)タンパク質をコードする温成構造遺伝子を定義している。族児成構造遺伝子は第1図の約~32番から約263番で示されるTミノ酸残器を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、族児成構造遺伝子は、第2図の約34番から約918番のスクレオチド塩医配列を

有することが誰ましい。

別の放復において、本発明は、ヒトの組織因子重領タンパク質をコードする1つの構造遺伝子を定義する第1のDNA断片と機能的に結合したベクターを含む組換えDNA分子も考案している。さらに抜組換えDNA分子は、第1の断片の5・末端に連続し、上記タンパク質に結合するアミノ酸残器リーダー配列をコードする第2のDNA断片を含むことが好ましい。すなわち、上記の第1及び第2のDNA断片は一特になって、上記タンパク質の前駆体をコードする混成構成遺伝子を定義している。

別の危機において、本発明は、わずか約50アミノ酸残益を含み、かつ式

- VNQVYT-

で装わされる配列に相当するアミノ放張器配列を含むヒトの組織 因子結合部位のポリペプチド類似物を考定している。

さらに好ましくは、本発明はわずか約5 B プミノ酸残器を含み、かつ、

- VELOVITVORT -.

- LYYWKSSSSEKKT -

からなる球から選択される式で表わされる配列に相当するアミノ 放残器を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考 変している。

さらに本発明の態様には、

a) ヒトの組織因子重領タンパク質と免疫反応する。

b)

また、本発明は、

- *) 生理学的に許容される希釈剤及び効果的な生体内指示手段と 結合させたハイブリドーマTF9-10H10によって作られ たある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者 に静脈注射により投与し、血栓中に存在するヒトの組織因子と 免疫反応させる。
- b) 協抗体分子が、血栓の一部として生体内に存在する組織因子 と免疫反応し、かつ、免疫反応動質を形成するのに十分な時間、 その投与を受けた被検者を維持する、
- c) ステップb) で生成した免疫反応生成物の存在を検定する。 以上a) ~ c) のステップを含む、生体内で血栓を検出する方法 も考案した。

さらに、本発明は、TP8-5G3及びTP9-6B4からなる即から選択されるハイブリドーマにより生産され、存在するとトの組織因子と効率よく結合する、ある量の抗体分子を含む生理学的に許容される粉別利を含有するモノクローナル抗体組成物を、被検者に静原住村によっと投与することを含む、生体内で、疫薬因子リノMaと結合するヒトの組織因子の能力を中和する方法も考案している。

また、本発明は、因子などは。と反応するのに有効な量の、

からなる耳から選ばれるポリペプチドを含む生理学的に許容され

からなる耳から選択される式で表わされるボリベブチドと免疫 反応する、

c) 実質的に第1回の部位204から部位226で示される式で 表わされるポリペプチドとは免疫反応しない。

抗体分子を含む抗体組成物である。

また、本発明は、ハイブリドーマTF8-5G9、TF9-10H10、TF9-5B7及びTF9-6B4と、それらハイブリドーマによって生成される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を考案している。

本発明は、

-) 身体試料を、ヒトの組織因子重額タンパク質と混合し、免疫 反応混合物を作る、
- b) その複合物を、抗体が、その試料中に存在するヒトの組織因 子と免疫反応し、免疫反応度物を作るのに十分な時間維持する、 そして、
- c) ステップ b) で生じた免疫反応度物の存在を検出する、 以上のステップを含む体液試料中のヒトの組織因子遺譲タンパク 質の存在を検定する方法も考案している。

る希釈剤を含有するポリペプチド組成物を、静原注射で被検者に 投与することを含む、生体内で、ヒトの組織因子が、蘇集因子は / Va » に結合することを阻害する方法を考案している。

別の厳様において、本発明は、本発明の抗体組成物を含有する パッケージを含む、試料中のヒトの組織因子重額タンパク質の存 在を検定する、キットの形をとった診断システムを考案している。 その抗体組成物は、

- a) TF 8 5 G 9.
- b) TF9-6B4.
- c) TP9-10H10,
- 4) TF9-5B7.

からなるハイブリドーマの野から選ばれたハイブリドーマにより 生度されるモノクローナル抗体を含むことが望ましい。

また、試料から血液凝集因子VI/VIaを単離する方法も考案された。

この方法は、

- a) 固体マトリックスに固定した、請求項15記載のポリペプチドを含む固体サポートとは料を混合することにより結合反応混合物を作る、
- b)上記結合反応複合物を、上記磁集因子が上記ポリペプチドと 結合し、固体複合体及び上情を作るのに十分な時間、維持する、 c)上記複合体から、上記上情を分離する、そして
- d) ステップ c の分離した複合体から、上記職集因子を回収する、以上、a) ~ d) のステップを含む。

さらに、実質的に、ヒトの組織因子軽額タンパク質を含まない、 生物学的に活性のあるヒトの組織因子重額タンパク質の水溶液を 含む組成物を含素した。この生物学的に活性のあるヒトの組織因 子重線タンパク賞は、リン設置又は、非イオン性界面密性剤中に 分散されていることが望ましい。

血管系統体試料中の凝集能力を検定するための、キットの形を とった診断システムも考案された。それは、実質的にヒトの組織 因子軽額タンパク質を含まない、少なくとも1回の検定を行うの に十分な量の、生物学的に活性のある、ヒトの組織因子重額タン パク質の水溶液組成物を含有するペッケージを含む。その重領タンパク質は、リン脂質中に分散されていることが望ましい。

別の起襟において、成熟したヒトの組織因子重復タンパク質の 調製法及びその方法によるタンパク質発現産物も考案されている。 この方法は、

- a) 栄養培地中、ヒトの組織因子重額タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片及びその第1の断片に連続し、かつ、上記タンパク質に付随するアミノ放残菌リーダー配列をコードする第2のDNA断片と鞭撻的に結合し、宿主本乳類細胞と適合する発現ベクターで、上記第1及び第2のDNA断片が上記タンパク質の胸駆体型をコードする流成構造遺伝子を定義するものであるようなベクターを含む組換えDNA分子でトランスホームした宿主ホ乳類細胞の均衡を開始する。
- b) その培養物を、上記細胞が、上記組換え DNA分子からタンパク質を発現し、かつ、上記成胎型のタンパク質を形成するのに十分な時間維持する、そして、
- c) 上記培養物から、上記放熟型のタンパク質を回収する、 以上a) ~ c) のステップを含む。

図式の簡単な説明

図式は本公開の一部を形成している。

第1図は、1文字アミノ酸残器コードを用い、左から右に、ア

トン (k) で示した見かけの分子量をもつ分子量援埠物質を示している。

第5回は、15%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、
因子切/切⇒の観和性で単離した h u T P のオートフルオログラムを示している。 h u T P の単離、 *** I によるラベル化及び電気泳動は、例4と同様に行った。 レーンA は、D T T による選元後の単離した h u T P を示している。 レーンB は、D T T 運元なして、電気泳動した同サンブルを示している。 上のバンド及び下のバンド (U及びしと要示した) は、各々、約58及び47kの大きさのh u T F に対応している。 オートフルオログラフィー後、上のバンド及び下のバンドを切り出し、D T T を含む S D S サンプルバッファ中で再次和し、第2の15%アクリルアミドゲルのサンブルバッファ中で再次和し、第2の15%アクリルアミドゲルのサンブルが、ファウで再次和し、第2の15%アクリルアミドゲルのサンブルが、ファウで再次和し、第2の15%アクリルアミドゲルのサンブルが、ファウで再次和し、第2の15%アクリルアミドゲルのサンブルが、ファウストのアクトンの場合された上のバンドの再電気泳動の結果を示している。125及び47キロダルトン (k)の見かけ上の分、子量をもつタンパク質が矢印で示されている。

第6図は、例4で説明されているように、まずhuTF特異的モノクローナル抗体で免疫沈殺化し、ついで8~17%のポリアクリルアミド勾配ゲルで電気泳動した、因子MグMIの親和性で早隠したhuTPのオートフルオログラムを示している。レーソAは、DTTによる運元を伴う、電気泳動した「33」ラベル化huTFを示している。レーンBは、運元なしで電気泳動した同サンブルを示している。

第7回は、15分アクリルアミドゲル中で電気決動した、因子 ロノVIsの規和性で単類したカロTFのオートフルオログラムを 示している。単類、'*** I によるラベル化、選元及び脱グリコシ ミノ末臨からカルホボキシ末端の方向で、ヒトの観権因子重低タンパク質の放熟型及び割組体(各々、 h u T F h 及びブレbuffb)の完全なアミノ散残器配列を示している。主な天然の成熟型タンパク質のアミノ散残器配列は、1番から263番に対応する。マイナーな成熟型タンパク質の配列は、3番のアミノ散残器から治立り、263番の残器で終わる。成熟プロセスで放棄を利した。から一定列(前駆体領域)に相当するアミノ 放残器配列は、マイナス番号で示した。 細胞外ドメイン及びトランスメンブレン・アンカー領域は各々、部位1~219及び220~242に対応する。第2図は、1文字ヌクレオチド塩器コードを用い、左から右に5・末端から3・末端の方向で、プレトuTFh及び列を示している。 h u T F h の構造遺伝子は塩器130から始まり、塩器918で終わる。

その読み枠は、各アミノ数を示す1文字を、対応するコドンの 中央の塩基上に置くやり方で、ヌクレオチド配列の上に推察され るアミノ酸残器を付置することにより示した。

第3回は、例2で説明されている、hu丁Fの凝血活性を制定するのに用いる、凝集検定を示す図である。阿対数プロットは、 むとミリリットル当りのピコグラムで表わしたとトの組織因子 (hu丁F) 濃度で示される、ヒトのクエン酸化血素柔集(柔血) 時間を示したものである。

第4図は、10 メポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、 図子リノリ a 親和性で単離した h u T F h のオートフルオログラ ムを示している。レーンA は、例 4 で説明されているように、単 離され、電気泳動前に、ジテオスレイトール(D T T)で遅元し た126] ラベル化 h u T F を示している。レーンB は、キロダル

ル化は、弱4で説明されているように行った。レーン1は、キロダルトンで扱わされた見かけ上の分子量をもつ複雑物質として電気泳動したタンパク質複雑物質:リゾチーム、14.3;カルボニック・アンヒドラーゼ、30.0;オパルブミン、46.0;ウシ血清アルブミン、69.0;オスよりラーゼも、92.5;ミオシン、200.0(オペて11州、アーリントンハイツ・アマーシャム社より入手)を示している。'** IートロTFを含むサンブルをDTT存在下(レーン2及び3)又は非存在下(レーン4及び5)で電気泳動した。これら'** IートロTF合有サンブルのいくつかは電気泳動的に脱グリコシル化し(レーン3及び5)、他のものは脱グリコシル化しなかった(レーン2及び4)。

レーン 8 及び 5 に流した^{18 1} ! - h u T P 含有サンプルは、電 気泳動前に脱グリコシル化され、レーン 2 及び 4 のものは脱グリ コシル化しなかった。

第8回は、例9で説明されているように、10%のポリアクリルアミドゲル中で電気体動した、免疫親和性で単離されたboffのオートフルオログラムを示してい。レーン1は、キロダルトンで表わされる見かけの分子量をもつ、マーカーとして電気体動した程準タンパク質:チトクロムC、124:ラクトグロブリン、184:カルポニック・アンヒドラーゼ、29.0;ラクテート・アヒドロゲナーゼ、35.0;及びホスホリラーゼ b、95.5 (全て、M人州ニュートンセンターのディバーシファィド・バィオテク(Diversified Biotech.)から人手した)を含んでいる。レーン2は、スミス(Saith)等のBCAタンパク質検定法(アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. biochee.)150

巻、76~85頁(1985年))を用いて湖定し、かつDTT

を用いて選元した約20μ8のタンパク賞を含んでいる。huff 重額(huffh)は、明らかに、およそ47Mrの位置に確認 され、huff軽額は、およそ125Mrの位置にわずかに確認 された。タンパク質は、レムリ(laemall)(ネイチャー(hature)、 227地、680~685頁(1970))の報告に徙がい、コ マージ・ブルー致色により可視化した。

第9図は、huTFhの非リン語質化(非陽質化)ボリベプチド類似物による、huTF由来の凝集開始阻害の投与一応答曲線を示すグラフである。 種々の環度の非勝質化ポリベプチドによる凝集阻害率は、例12に健弱されているように測定した。 テストしたポリペプチドは、 $p26-49(\Delta TF26.49)$ 、p121-155(O、TF121、155)、<math>p146-167(Φ、TF146、167)及びp204-226(甲、TF204、226)である。

第10回は、AuTFAのリン融資化した(監質化した)ポリペプチド類似物による、AuTF由来の凝集開始阻害に関する投与一応答曲線を示すグラフである。その阻害率は例9で説明されているように、同方法により、関係但物に対して測定した。

併19に述べられているように測定した。白丸(O)はTF8-5C9抗体を示し、黒丸(●)は無関係の抗体を示している。

第16図は、抗丁ドモノクローナル抗体丁ド8-5G9による特製したヒトの陽丁ドの凝血活性の阻害を示している。リン設質ベンクル中に再構成された、特製したヒトの陽丁ドの凝血活性は、横々の速度の特製IェGと、37c30分間、前処理した後側定した。丸は、抗丁ド抗体丁ド8-5G9に対するもので、三角は、然関係なコントロール抗体ドムト100に対するものである。データは、抗体を加えない場合の活性に対する阻害率として表わされている。

第17図は、精製した抗丁ドモノクローナル抗体で処理した、 培養されたJ82勝脱がん初胞に対する阻容因子での結合及び、 その細胞による因子×ョの形成を示している。因子×ョの形成本 の阻害の値は、三角で表わされ、因子¾の結合阻害の値は、丸で 表わされている。データは、抗体を加えないでインキュペートし た細胞を用いて得られる値に対する阻害率で表現されている。パ ネルAは抗体丁ドリー2C(の効果、パネルBは、抗体丁ドリー 5B7の効果を示している。

第18回は、何25で述べられているような、免疫観和性で章階したカロTFのウェスタンブロット分析を示している。15%ポリフクリルアミドゲルに次に示すものがかけられた。レーン1は、キロダルトン(k)でパネル人の左に示された見かけの分子量をもつ分子量復歩が含まれる。レーン2は、電気泳動前に選元された、接製ヒトヘモグロビン1gを含んでいる。レーン3は、単離したカロTFを電気泳動前に選元したもの0.5μgを含んでいる。レーン4は、非選元の、単離されたカロTF0.5μgを含んでいる。SDS-PAGB後、生じたタンパク質パンドを電気

3'の方向で含んでいる。また、例15で述べられている種をの 組換えDNA分子を構築するのに用いられた挿入物内の制限酵素 切断部位のおよその位置も示されている。さらに、完全な形で示 されるリーダーペプチド([記記])及びトランスメンブレン・ア ンカードメイン([222])をもつプレトロTFトタンパク質のお よその位置も示してある。

第12図は、huTFhの非リン胆質化(非脂質化)ポリペプチド類似物による、huTF由来の凝集関始の阻害を示す、没与一匹答曲線のグラフである。モル構度で表わした機本の機度の非脂質化ポリペプチドによる軽繁の阻害率(%)は、例12に述べられているように拠定した。試験したポリペプチドは、p24~35(△)、p26~49(○)、p152~169(□)及びペプチドp40~71、p72~104、p94~123及びp161189であるがこれらは全て、実質的な阻害を示さず、集約的に黒丸(◆)で示した。

第13回は、TF8-5G9抗体組成物による凝集阻害の速度 論を示すグラフである。凝集の阻害率(劣)は、例18で述べら れているように測定された機々の抗体免疫反応時間にわたってプ ロットしてある。

第14図は、カップア由来の最美の抗カップア抗体による阻害 の投与一応答を示すグラフである。積々の濃度の抗カップアモノ クローナル抗体TF8-5G9による基集の阻害率(%)は例 19に述べられているように測定した。

第15図は、カロケF派がヒトの総理券細胞系列GM1381の細胞玻璃物である。カロケド由来の番魚の、抗カロケF抗体による配客の投与一応答のグラフである。種々の規定の抗カロケドモノクローナル抗体でド8-5G9による概量の図答率(M)は、

泳動的にニトロセルロースに移した。このようにして作ったウェスタン・プロットを $0.2 \mu g / m g$ の観和性精製したウサギ抗 $h u T P l_g G$ (パネルA)、 $1 \mu g / m g$ のカサギ抗へモグロビン1 g G (パネルB) 又は、 $1 \mu g / m g$ の p 免疫 ウサギ 1 g G (パネル C) と免疫 反応させた。免疫 染色した パンドの見かけの分子量を右に k D m r 示した。

発明の詳細な説明・

A. 定義

アミノ酸: ここで同定される全てのアミノ酸は、天然のL-型のものである。 複単的ポリペプチド命名法に従がい (ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、243 巻、3557~59頁(1969))、アミノ酸残落の略号は、次の服金表に示されているとおりである。

対 応 賽

32	뤗	アミノ放
1文字	3文字	•
Y	Tyr	チロシン
G	G 1y	グリシン
F	P he	フェニルアラニン
М	Met	メチオニン
Α.	Ala	アラニン
s	Ser	セリン
L	J 1e	イソロイシン
L	Lou	ロイシン
T	Thr	スレオニン
v	V =1	パリン
P	Pro	プロリン

к	Lys	リジン
н	Hia	グルタミン
٩	Gla	グルタミン
E	Gie	グルタミン酸
w	Trp	トリプトファン
R	Arz	アルギニン
D	Asp	アスパラギン政
N	Ass	アスパラギン
С	Суз	システィン

ここでは、全てのアミノ酸配列は、世来どおり左から右に、アミノ酸末端からカルボキシ末端への方向で示されていることに注意を娶する。さらに、アミノ酸残器配列の始め又は終りのダッシュは、各々、アミノ及びカルボキシ末端のH及びOH(水煮及び水酸器)のようなラジカルへの結合、もしくは、ボリベブチド値における1から約15残器の1つ以上のアミノ酸残器配列を示している。

ポリペプチド及びペプチド:ポリペプチド及びペプチドはここでは、協合う製薬のアルファアミノ番とカルポキシル器の間のペプチド結合により互いに直鎖的に結合した。わずか約50アミノ酸残器を意味するものとして互換的に用いられている。

タンパク質:タンパク質は、ポリペプチドのように互いに値復 - 的に結合した50以上のアミノ酸残器を意味して用いられている。

ヌクレオチド: 標部分 (ペントース)、リン酸及び窒素へテロ 類塩高からなる DNA又はRNAの早量体ユニット。この塩基は グリコシド炭素 (ペントースの 1 、炭素) を介して糖部分と結合 しており、塩高と糖の組合せはヌクレオシドと呼ばれる。ヌクレ オシドがペントースの 3 、又は 5 、 節位に結合するリン酸器を含

パク質をコードする構造遺伝子を形成するDNA配列がDNA断 片中に含まれることが望ましい。その遺伝子はhuTFh又はプレhuTFhタンパク質中にあるアミノ酸残器をコードする各コドンが中断することなく連続して存在する、すなわち、イントロンを含まない遺伝子であることが好ましい。

従って、第2図に示される、5′末頃の約130番から、3′末時の約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、bulfbbを発現することができるDNA断片が本発明の1版機を構成している。第2図に示される、約34番から約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、プレカロTPAを発現できるDNA断片が、本発明のもう1つの賠機を構成している。

好ましい、可特性のトuTFト分子は、トuTFトをコードするDNAの5、来端の約150塩器によってコードされるアミノ酸残器を欠いている。従って、第2図で示される、5、末端の約130番から約756番を経由して、3、末端の約801番の部位までの配列を沓本的に含み、かつ、可辞性のトuTFトを発現できるDNA断片は、本発明のさらに好ましい駐機を構成する。可溶性のトuTFト精造遺伝子を形成する、典型的な好ましいDNA断片は、第2図で示されている、約130番から約756番約130番から約801番で変わされるヌクレオチド配列を有するよのアネス。

可溶性プレカロTFAをコードする、好食しいDN人断片は、 それらが、第1団で示されるように、-32者から0巻までのアミノ酸残器で示されるような、アミノ末端リーダー配列を含むタンパク質をコードしていること以外は、可溶性カロTFAをコードしているものと同じである。従って、可溶性プレーカロTFA むとき、それをヌクレオチドと呼ぶ。

塩基対 (b p) : 二本質 D N A 分子内でのアデニン (A) とチョン (T) 又はシトシン (C) とグアニン (G) の組合せ。
R D N A 断片

生物において、タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列は遺伝子コードを介して、そのタンパク質をコードする構造遺伝子のデオキシリポ核酸 (DNA) 配列に直接関係づけられる。従って、構造遺伝子は、それがコードするタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸残差配列で定義することも可能である。

重要でかつよく知られた遺伝子コートの性質にリダンダンシーがある。すなわち、タンパク質を作るのに用いられるほとんどのアミノ改に対し、1つ以上のコードするヌクレオチド・トリプレット (コドン) が、1つのアミノ改残器をコード又は指定している。それ故、1つのアミノ改残器配列をコードするのに多くの異なるヌクレオチド配列が存在することになる。そのようなヌクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ改残器配列を生産することが可能なので、機能的には準値であると考えられている。場合によっては、プリン又はピリミジンのメチル化物がヌクレオチド配列の中に組込まれている事もある。しかし、そのようなメチル化は、コード関係にはなんら影響しない。

本発明のDNA断片は、ヒトの組織因子重領タンパク質(huffh)をコードするDNA配列を含むという特徴をもつ。好ましい監接において、このDNA断片は、ヒトの組織因子重額前駆体タンパク質(プレルuTFh)をコードするDNA配列を含んでいる。すなわち、本発明のDNA断片は、huTFh、また、よう好ましくは、プレーカuTFhの構造遺伝子の存在で特徴づけられる。さらに、可容性のカロTFh又は可容性のプレーカuTFhタン

をコードする構造遺伝子を形成している、好ましいDNA断片は、 基本的に、第2図で示されている5 * 末端の約3 4 香から7 5 6 者を経由して、3 * 末端の約8 0 1 香で示される配列を含んでい る。典型的な好ましい可溶性のプレカロTFカコードのDNA断 片とは、第2図で示されているところの、約3 4 香から約7 5 6 番、約3 4 番から約7 7 1 春、約3 4 番から約7 8 6 番及び約 3 4 香から約8 0 1 番のヌクレオチド塩基配列を有するものであ る。

可溶型も含めて、上記トロTFト及びプレトロTFトタンパク 質をコードする相同的DNA及びRNAも先に関請したように考 寒された。

カuTFh及びプレhuTFhをコードするDNA断片は化学的技術、例えばマテウシ(Natteoccl)等のホスホトリエステル法 (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー・(J. Aa. Chea. Soc.) 103巻3185頁(1981年))により容易に合成できる。(ここで引用されている技術の公開は参考として組込まれている。)もちろん、コード配列を化学的に合成することにより本来のアミノ酸残器配列をコードする代りに適当な爆姦を用いることにより、いかなる修正も望みどおりにすることができる。しかし第2回に示されているものと全く相同的な配列を含むDNA分子の方が望ましい。

さらに、基本的に h u T F 及びプレ h u T F h タンパク賞をコードする構造違伝子を含む D N A 断片は、これらの遺伝子を含む 組換え D N A 分子から得ることができる。 例えば、プラスミドタイプの組換え D N A 分子 p C T F 6 4、 p C T F 3 1 4 及びpCTF 4 0 3 はいずれも h u T F h 及びプレ h u T F h タンパク賞の異なる領域をコードする D N A 区列を含んでおり、また、これらを 合せると、各タンパク質を発現するのに必要な金でのDNA配列 を有することになる。各々、pCTF64、pCTF314又は pCTF403でトランスホームした大鶏菌の培養物は、1987年 3月27日、ブダベスト協定に益づき、MD州、ロックビル、パ ークローン、ドライブ12301者、アメリカン・タイプ・カル チャー・コレクション(ATCC)に保管され、各々、受理番号 67370、67368及び67369が割当てられた。

huTFh又はプレhuTFhをコードするDNA位列を含む DNA断片は、よく知られている方法を用い、先に述べた各プラスミドからの適当な制限断片を機能的に結合することにより作ることができる。典型的に、本方法で作られた本発列のDNA分子は、粘著末端、すなわちこの分子の二本領領域を越えて伸びた
* 突き出した。一本領領域をもっている。本発明のDNA分子上に粘著末端があることは望ましいことである。

本発明は、上述のDNA断片と等価なり求技数(RNA)も含 多している。

C. 組換えDNA分子

本発明の組換えDNA分子は、本発明のDNA断片をベクターに機能的に結合することにより作ることができる。

ここで用いられているように、"ベクター"という言葉は、初 腹中で自己複製できるDNA分子で、別のDNA所片を機能的に 結合することができ、その結合した断片の複製をもたらすものを 寒味する。huTFh及びプレhuTFh遺伝子の発現を罰るこ とができるベクターは、ここでは"発現ベクター"と呼ばれる。 従って、組換えDNA分子(rDNA)とは、天然においては遺 常一緒にいることはない少なくとも2つのヌクレナチド配列を含 むハイブリッドDNA分子のことである。

パイオラド・ラポラトリーズ社) 及びpPL、pKK223(NJ 州、ピスカタウェイ、ファルマシア社) がある。

実技知数、好ましくは脊椎生物細胞と適合する発現ベクターも、本発明の組換え DNA分子を作るのに用いられる。実技細胞発現ベクターもこの分野でよく知られており、数社から市販されている。 典型的にはこれらのベクターは、目的とする DNA 断片の挿入に便利な制限部位を含んでいる。これらのベクターの典型的なものには、 pSUL及び pKSV-10(ファルマシア社)、 pBPV-1/pML2d(インターナショナルバイオテクノロジー社)及び pTDT1(ATCC. #31255)がある。

好変しい態機において、本発明の組換えDNA分子を構築するのに用いられる実体性和散発現ペクターは、実体性和散中で効果的な選択マーカー、好ましくは、深知耐性選択マーカーを含んでいる。好ましい面割耐性マーカーとは発現によりネオマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo) 遺伝子である。サウザーン(Southera)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. Bol. Appl. Genet.)1 巻、327~341頁(1982年)。

本発明のIDNAを作るための、レトロウイルス発現ベクターの使用も考案されている。ここで用いられているように、『レトロウイルス発現ベクター』とは;レトロウイルスゲノムのロング・ターミナル・リピート(LTR)領域由来のプロモーター配列を含むDNA分子を意味する。

好ましい駐機において、典型的な発現ベクターは、真体細胞中では複製不能なレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルス発現ベクターである。レトロウィルスの構築と使用法は、ソージ(Sorge)等により解告されてい

本発明のDNA断片を複能的に結合させるベクターの選択は、この分野ではよく知られているように、例えば、タンパク質の発現などの機能的性質及びトランスホームされる宿主細胞などが組換え DNA分子の排签技術の上で本質的な制限となることから、これらに直接依存する。しかし、本発明によって考案されたベクターは、これに複能的に結合している DNA 断片中に含まれる hu TF h 又はプレ hu TF h 遺伝子の、少なくとも復盟を、好ましくは発現をも可能にする。

好きしい酸様において、本発明により考案されたベクターは、 原核性のレプリコン、すなわち、バクテリア宿主細胞のような原 核細胞中の、これをトランスホームした集色体外組換えDNA分 子の百己複製及び維持を可能とするDNA配列を含んでいる。こ のようなレプリコンは、この分野ではよく知られている。さらに、 原核性レプリコンを含むこれら監機は、これをトランスホームし たバクテリア宿主に運利耐性を与える遺伝子も含んでいる、典型 的なバクテリアの取利耐性遺伝子は、アンピンリン又はテトラサ イクリンに対する耐性を与えるものである。

原体性レブリコンを含む、これらのベクターは、これをトランスホームした大路間のようなバクテリア宿主細胞中で、bullPh 又はプレカullFhに任子を発現(転写及び翻訳)させることができる原核性プロモーターも含んでいる。プロモーターとは、RNAがリメラーゼの結合を許し、転写を開始させる、DNA配列でできた発現コントロール要素である。バクテリア宿主と適合するプロモーター配列の典型的なものは、本発明のDNA断片の対入に便利な制限部位を含むプラスミドベクター中に存在する。このようなベクタープラスミアの典型的なものには、pUC8、pUC9、pBR329 (CA州、リッチモンド、

る(モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロジー(No). Cell. Biol.) 4巻、1730~87頁(1984年)。

相構的なホモポリマー末端を介して、DNAをベクターに観覚的に結合する多くの方法が関発されてきている。例えば、相構的なホモポリマーを、挿入するDNA断片及びベクターDNAに付加することができる。それから、このベクターとDNA断片を相構的ホモポリマー末端間の水素結合で結合し、組換えDNA分子を作る。

多種の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、 CN州ニューヘブン、インターナショナル パイオテクノロジー 社を含む多くの会社から市販されている。

本発明は、上述の組換えDNA分子と等価なRNAも考案して

いる.

D. トランスホームした紐腔と培養

本発明は、本発明の組換えDNA分子、好ましくは可溶性の huTPh又はプレhuTPhを発現できる「DNAでトランス ホームした宿生細胞にも関連している。この宿主細胞は、原体性 でも真体性でもよい。バクテリア細胞は、原体宿主細胞であるこ とが好ましく、また典型的には、ND州ベセスダ、ベセスダ・リ サーチラボラトリース社から入手できる大腸密DH5株のような、 大陽密の株である。好ましい実体性有主細胞には、イースト及び 本乳類細胞、好ましくはマウス、ラット、サル又はヒトの総維芽 細胞には、CCL61としてATCCから入手できるチャイニー ス・ハムスターの卵巣(CHO)細胞及びCRL1658として ATCCから入手できるNIHスイスマウス胚細胞がある。

本発明の組換え DNAによる通当な知飽宿主のトランスホーメーションは、典型的には用いるベクターのタイプに応じて、よく知られている方法により行なわれる。例えば、原体性宿主和胞のトランスホーメーションに関しては、コーエン(Cohen) 等のプロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、69巻、2110頁(1972年):及びマニアチス(Haniatls)等のNY州コールド・スプリング・ハーバー・コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、ラボラトリー・マニュアル、モレキュラー・タローニングを参照せよ。 穿推動物細胞の「DNAを含むレトロウイルス・ベクターによるトランスホーメーションに関しては、例えば、ソージ(Sorge)等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.)4巻、1730~37頁(1984

バク質が生じる。

プレカセTF A 抗原性を示すタンパク賞、またさらに好ましくは、 生物学的に活性なカセTF A を含むことが望ましい。

トランスホームした宿主和路を符号するのに有用な栄養培地は 当分野ではよく知られており、また、いくつかの販売会社より市 版されている。宿主細胞がお乳類細胞であるような腹様において は、「無血液」培地を使うことが望ましい。

B. huTFA及びプレhuTFAタンパク質の生産方法

本発明の別の特徴には、 h u T F h 抗順性を示すタンパク質の 生 屋方性がある。 h u T F h 抗原性を示すタンパク質は天然の組 機因子によって誘導される抗体を免疫反応を起こすタンパク質で ある。 h u T F h 抗原性を示すタンパク質は、抗順として有用で あり、又、抗体を生じさせるときにも有用で、その各々が本発明 の体断システムや体断法で使用することができる。

本方法は、huTFhN以ばプレルuTFhN、好家でしてはできる。している。本発明の組織え口NA分子でトランスかームした宿主部間始まる。この培養を、そのトランスかームした相関がよりない。この培養を、そのトランスかームした相関がよりないで、本発明の方法によって作られたhuTFhの生物学的活性すなわち、因子リンパク質を発現するのに十分好きしいの質量によって作られたhuTFhの生物学的活性すなわち、因子リンパクである。おけて、本発明の方法によって作られたhuTFhの生物学的活性すなわち、因子リンパクである。おけて、本発明の方法に、宿主細胞において、してすり、遺伝子を発現できる。その培養によっていいます。

年)、グラハム(Graham)等、ウィロロジー(Virol.)。52巻、456頁(1973年):及びウィグラー(Wigler)等、プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.)USA、76巻、1373~76頁(1979年) 本会関サ上。

うまくトランスホームされた報節、すなわち、本発明の組換え DNA分子を含む細胞は、従来の方法によって同定することがで まる。例えば、本発明の r DNAの導入から生じた細胞をクロー ン化し、モノクローナルコロニーを作る。これらのコロニーから 細胞を収穫し、溶解し、そのDNA内容物について、サウザーン (Southern)(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Hol. Biol.) 98巻、503頁(1975年)又は、ベレ ント(Borent)等(バイオテクノロジー(Biotech.) 3巻、208 頁(1985年)によって報告されている方法を用いて、その r DNAの存在を調べた。

r DNA存在の直接的検定に加え、成功したトランスホーメーションは、そのr DNAが h u TF h 又はプレ h u TF h を発現することができるときは、従来の免疫学的方法で確かめることができる。例えば、発現ペクターでうまくトランスホーメーションできた知識は、 h u TF h 又はプレ h u TP h 抗原性を示すタンパク質を生産する。トランスホームさせた細胞試料を収穫し、本発明のハイブリドーマによって生産される抗原等に特異的な抗体を用い、h u TF h 又はプレ h u TP h を検定する。

このように、トランスホームした宿主相談それ自体に加え、本 発明は、栄養培地中のそれらの細胞の培養物好ましくは、モノクローナル (クローン的に均一な) 培養物、又は、モノクローナル 培養物由来の培養物も考案した。この培養物は、huTFh又は

培養物から、発現したタンパク質を回収する方法は、当分野ではよく知られたことであり、従来の生化学的方法を用い、その培養物のタンパク質含有百分の分面が含まれる。例えば、タンパク質の分面に対して知られているゲルは過法、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー及びそれに類するものが、培養物中にある発現タンパク質の単離に用いることができる。さらに、免疫観和性、免疫吸着やそれに質するもののような、免疫化学的方法も、従来法を用いて行なわれる。

F、 h u T F h 及びプレ h u T F h タンパク質組成物と発現度物本発明は、また本発明の r D N A の h u T F h 及びプレhu I F h タンパク質発現産物も考案している。好きしい危後において、h u T F h 及びプレhu T F h 発現度物は第1因で示されているように、各々残差1から263及び-32から263に対応するフミノ 歐残差を有している。その発現タンパク質は、第1因で示されるプレhu T F h 及び h u T F h の T ミノ酸残差配列の長さの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%であることが翌ましい。

別の監操において、可溶型のカuTFh及びプレカuTFhと、可溶性カuTFhそして、または可溶性プレカuTFhを含む組成物も考案されている。ここで用いている。可溶性。という言葉は、本来のカoTFh及びプレカuTFh分子の細胞外ドメイン、すなわち、第1図に示すところのアミノ末端から残苦220までの、カuTFh及びプレカuTFh分子で意味する。それゆえ、可溶性カuTFh及びプレカuTFh分子を意味する。それゆえ、可溶性カuTFh及びプレン・アンカー領域の実質的邸

分(第1図で示すところの残落220から242)を含まない。 ここで用いている。カロTFカ。及び「プレカロTFh。という 言葉は今後特にことわらないかぎり、そのタンパク質の可溶型を 含んでいる。

可存性の h u T F h 及び可容性 プレ h u T P h は、疏水的なトランスメンブレン・アンカー領域を含んでいないので、これらは、生理学的に許容される水溶液中で実質的に凝集することはない。それゆえ、可容性の h u T F h 及び可溶性の プレ h u T F h 及 が の 少なくとも 約70%、好ましくは 約80%、そして よ り 好ましくは 約80%(重量パーセント)が非 凝集(単量体)型であり、タンパク 質溶液 ーセント)が非 凝集(単量体)型であり、タンパク 質溶液中に アクション の ま / m ま を含んでいる。

好さしい可容性 h u T F h タンパク質は第1 図で示されているところの、アミノ末端の残器的1 書から、209 香を経由してカルボキシ末端の残器224 書で示されるアミノ放残器を示している。従って、好なしい可容性 h u T F h タンパク質は第1 図で示すところの約1 書から約209 書、約1 巻から約21 9 香及び約1 書から約224 春の残器で表わされるアミノ放残器配列を有するものである。

好ましい可容性プレトロTPトタンパク質は、第1図で示すところの、アミノ末端の-32番から、209番を径由して、カルポキシ末端の224番の残酷で表わされるアミノ放残器を有している。従って、好ましい可容性プレトロTFトタンパク質は、第

下、血管系統状サンプルを凝集する能力を意味する。凝集能力を 検定するのに十分な、典型的huTFhタンパク質濃度は、例2 におけるサンプル/huTFh比と同じ比を用いたとき、約0.1 ps/=2から約100ng/o2、好ましくは、約1pg/=2 から約10pg/=2、そしてより好ましくは約10pg/=2から約1ng/=2である。もちろん、凝集能力を検定するときに必要な濃度よりも高い濃度であるが、好ましい濃度に希釈しうるhuTFh溶液も考慮されている。

好ましい結構において、huTFh合有水溶液は、リン陰質又は非イオン性界面括性剤中に分散されたhuTFhを含んでいる。 集型的リン腺質:huTFhタンパク質重量比は、約5:1から 12000:1、好ましくは、約50:1から約5000:1そ してきらに好ましくは、約100:1から2500:1の範囲で ある。

G.ポリペプチド

本発明の各ポリペプチドは、せいぜい約50個、より通常には 約35個以下の、そして好ましくは約25個以下のアミノ散残基 を含んでおり、かつ、少なくとも10個の残器を含んでいる。さ らに、本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸残器配列及び新し い機能特性を特徴としている。

世って、本発列のポリペプチドの1つの競技は、血液聚集因子 Vi/VisへのhuTFhの結合を競合的に阻害する能力をその特 飲の1部としている、huTFh結合部位ポリペプチド類似物で ある。本発列の結合部位類似物は活性化した複合体を作ることな く、すなわち、発無を開始することなく因子Vi/Visに結合する ことが望ましい。

ここで用いている"複合体"という言葉は、抗原-抗体又は、

1 図で示すところの約-32 各から21 4番、約-32 番から219 香、及び約-32 番から約22 4 番の残器で表わされるアミノ放残器配列を有するものである。

1 つの態様において、トロTFト及びプレトロTPト発度物は グリコシル化されていない。すなわち、それらは、本発明のIDNA でトランスホームした原体和散中で生産される。

非グリコシル化型のhuTFh及びプレhuTPhは、本発明の控徴物及び診断シスチムにおける免疫順及び抗原として有用である。

奥型的には、真核細胞で生産されたカロTF h及びプレbuff hはグリコシル化されており、文た抗原性及び免疫原性に加えて、生物学的活性を有する。ここで用いられているように、"生物学的活性"という語句は、因子W/Waの依存の最無を誘導する能力をもつカロTF h 又はプレカロTF h タンパク質又はポリペプチドを指して使われる。

このように、本発明は、実質的にヒトの組織因子経額タンパク質を含まない生物学的に陪性なカロTFAを含有する水溶液を含む組成物を考案している。その組成物も実質的に例えばラウリル酸酸ナトリウム等のイオン性界面活性剤、ポリアクリルアミド及びSDSーポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDSーPAGE)で測定される的、15000ダルトン以下の見かけの分子量を有する組織由来のタンパク質のような物質を含まないことが望ましい。

水溶性のカロTFト合有溶液は血液又はクエン酸化した血漿の ような血液由来の度効のような血管系液状サンブルの凝集能力を 検定するのに十分な生物学的に活性のあるカロTFトを含んでい る。 "磁集能力"という語句は生物学的に活性なカロTFト存在

レセプターーリガンド反応のような特異的結合反応の座物を意味 している。代表的複合体としては、免疫反応座物及びここでTFi VI/VI a と示されているところの組織因子 - 因子VI/VI a 結合反 応座物がある。

好をしい怠機において、カロTFh結合部位類似物は、少なく とも第1図に示されている30~35番のアミノ酸残器を表わし ている次に示すアミノ酸残器を到:

- V N Q V Y T -

を含んでいる。

さらに好ましくは、カロTFh結合部位類似物は、少なくとも、 次のアミノ設残器配列:

- VNQ VYT VQ I ST-及び

-LYYWKSSSSGKKT-

のうちの1つを含んでいる。

これらの配列は、第1図で示すところの各々、30~40及び 155~167者の、huTFhのアミノ放残器を示している。

さらに一層好主しい場合は、 h u T F h 結合部位類値物は第 1 図で示すところの、各々 2 6~4 9 香及び 1 4 6~1 6 7 香で表わされている、次のアミノ酸残益配列;

- EPKPYNOYYTVOISTKSEDWKSKC -.

- VFGEDLITTLYYWXSSSSGKKT - .

からなる群から選ばれたアミノ放及基配列を含む。

好ましいhuTFh結合部位ポリペプチド類似物は第1支で示されているアミノ設殊益配列を含んでいる。

第 1 表

名 称*

アミノ放張基配列

a. 各ポリペプチドの実験名は第1図の、含まれているアミノ 酸残器配列を表わしている。

ポリペプチドp26~49、p146~167及びp151~189も、抗トロTFト抗体分子がトロTFトに結合するのを中和(数争的阻害)する能力を特徴としている。抗トロTFト抗体のトロTFトへの結合を中和する能力をもつ本発明の他のポリペプチドは、第2表に示されているものである。

第 2 表

名 称

ナミノ酸残益配列

a. 実験名に付けられた。C. は、タンパク質結合のためのリ ンカーとして、示されている配列に付け加えられたシスティ

れる。リンキングに使われる典型的アミノ酸残落は、チロシン、システィン、リジン、グルタミン酸及びアスペラギン酸とそれに 類するものである。さらに、本発明のポリペプチドは、末端28。 基アシル化、例えばアセチレーション又はチオグリコン酸アミデーション、ターミナルカルポキシアミデーション、例えば、アンモニア、メチルアミン、その他により配列が修飾を受けていることで、天然の配列とは異なることがある。

キャリャー・ハプテンのように、当分野でよく知られているリンカーを介してのキャリヤーとの結合の場合、本発明のポリペプテドは、カロTF N と免疫反応する抗体を誘導することができる。免疫学的な交差反応性の明白な原則からみで、本発明は、第1表及び第2表で示されているポリペプチドの抗原的に関連したパリアント・も考案している。 * 抗原的に関連したパリアント * とは、第1変もしくは第2数のポリペプチドの、少なくとも6個のアミノ酸残器配列領域を含み、かつ、第1数又は第2数のポリペプチド及びカロTFNと免疫反応を起こす抗体分子を誘導することができるポリペプチドのことである。

また、ポリペプチドがリン勝質又は非イオン性界面活性剤中に分散した、 h u T P h 結合部位ポリペプチド類位物の水性溶液を含む組成物を、本発明は考定している。 典型的なリン脂質:ポリペプチド重量比は、約5:1から200:1、好ましくは約30:1~80:1、さらに好ましくは、約45:1~55:1の範囲にある。リン脂質中に分散して使用するのに適している好ましい h u T P h 結合部位類似物をセクションII の第4表にリストした。

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの分野ではよく知られているいくつかの方法で合成することができる。使用しうる多くの技術のすぐれたまとめは、J. N. スチワード(Steward)及び

ン残器を示している。

本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドが因子リンリュへの結合に対し、本来の組織因子と競合でき、そして、または、 カロTF hに対する抗hu TF h抗体分子の結合を競合的に阻害 しうるかぎり、hu TF hのアミノ酸残器区列と同一である必要 がないことを理解すべきである。それ故、本ポリペプチドは、使 用する際に有利となるような、保存的、非保存的にかかわらず挿 入、欠失及び置換のような強々の変化を与えることができる。

保存的置換には、あるアミノ酸残器が他の生物学的に同様の残器に置き換ったものである。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニンのような資水的残器間の置換又は、アルギニンとリジン、グルタミン酸とアスパラギン酸又はグルタミンとアスパラギン及びそれに類するもののような極性残器間の置換がある。また。保存的置換。という語句には、もし、ボリベプチドが、必要とされる結合活性を示すならば、未置換の元々のアミノ酸の代りに、置換されたアミノ酸を置いることも含まれる。

本発明のポリペプチドが、1つ以上の保存的、もしくは非保存的関係をしているために、本来のhuTFhの配列と同一ではない場合、本発明のポリペプチドがラベル又は固体マトリックス、又はキャリヤーにうまく固定する。リンカー。を提供する目的で、その各末端に付加的残益をつけ加える場合は別にして、アミノ酸残蓄の遺席せいぜい約20パーセント、より普適には、せいぜい10%が電換している。本発明のポリペプチドと共に使用されるラベル、固体マトリックス及びキャリヤーは以下に述べる。

適常、アミノ酸残器リンカーは、少なくとも1残器であり、また40以上の残器のこともあり、しばしば1~10残器が用いら

J. B. ヤング (Young) の * 固相ペプチド合成 * (1969年、サンフランシスコ、H. B. フリーマン (Freeman) 社) 及びJ. メイエンホーファー (Helephofer) の * ホルモン性タンパク質及びペプチド * (1983年、アカデミックプレス社 (ニューローク)、2 老、4 6 頁) が固相ペプチド合成について、またE.シュローダー (Schroder) とK.クプケ (Kubke) の * ペプチド * (1965年 アカゴミックアレス社 (ニューローク) 1 素) が

(1965年、アカデミックプレス社(ニューヨーク)1巻)が 古典的な液相法について行なわれている。

B.接種物

別の 脳様において、本発明のポリペプチド又は、その抗順的に 関連したパリアントは、生理学的に許容しうる水性 新釈剤組成物 として、その効果的量が投与された時、 h u T F h と免疫反反 る抗体を誘導することができる接種物となる。 機 * の文法型の * 接種物 * という語は、 h u T F h に対する抗体の調製に用いられる活性成分として、 本発明のポリペプチドを含む組成物として、 ここで使用されている。 ポリペプチドを誘導するのに用いられるとき、そのポリペプチドは、単独で、又は結合体として中 +リヤーと結合して、又は、ポリペプチド重合体として用いられるのであるが、表現の簡便性のため、本発明のポリペプチドの種 + の症被は、全て、 * ポリペプチド * という語及びその種 * の文法型で呼ばれていることを理解されよう。

約3 δ以下のアミノ酸残器を含むポリペプチドに対し、すでに 記されているように抗体生産の誘導のためには、キャリャーに結 合したペプチドを使用する方が望ましい。

すでに記してきたように、1つ以上の付加的アミノ政務基をポリペプチドのキャリヤーへの結合を助けるため、そのポリペプチドのアミノ又はカルポキシ末端に付加することができる。ポリペ

特表平1-503438 (13)

プチドのアミノ又はカルボキン実際へ付加したシスティン残器は、ジスルフィド結合を介して、結合体を作るのに特に有用であることが分っている。しかし、結合体を調整の当分野でよく知られている他の方法も使用しうる。代表的付加結合法にはミカエル付加反応重物、グルタルアルデヒドのようなジアルデヒド(クリプスタイン(Klipstein)等(ジャーナル・オブ・インフェクシャス・デシーズ(J. Inpect. Dis)、147巻、318~326頁、(1983年))及びそれに護するものの使用、又は、キャリヤーに対し、アミド結合を生ずる、水溶性カルボジイミドの使用ような、カルボジイミド法の使用が含まれる。活性官能基を介してのタンパク質の結合については、オーラメアス(Auraneas)等のスカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Scand. J. Insunol.)8巻、掃1、7、7~23頁(1978年)を参照せよ。

有用なキャリヤーは、当分野ではよく知られておう、一般的にはタンパク質そのものである。そのようなキャリヤーの代表例としては、キーホール、リンペット、ヘモシアニン(KLH)、エデスチン、チログロピン、子クシ血清アルブミン(BSA)やヒト血清アルブミン(HSA)のようなアルブミン残、ヤギホ血球(SRBC)のような赤血球球、テタナストキソイド、コレラトキソイド、ポリ(ローリジン: ローグルタミン設)のようなポリアミノ政及びこれに鎖するものがある。

キャリヤーの選択は、その接種物の最終的使用法に依存しており、本発明に特に関係しない基準に基づいている。例えば、接種される動物中で不都合な反応を超こさないキャリヤーが選択されるべきである。

本発明の接種物は、典型的には、キャリヤーに結合した結合物

として、効果的な免疫原量の本発明のポリペプチドを含む。他の事項の中で、単位投与量当りの効果的なポリペプチド量は、当分野ではよく知られているように、接種される動物構、その動物の体置及び選択した接種レジメンに依存する。典型的に、接種物は、接種(投与)当り約10マイクログラムから約50ミリグラムのポリペプチドを含んでいる。

本発明の接種物に用いられている"単位投与"という目句は、 各ユニットが、必要とする希釈剤、すなわち、キャリヤー又はビ とクルと共に望ましい免疫原的効果を遅むのに必要な予め決めら れた量の活性物質を含む、動物に対する1回の投与に適した物理 的に分離した単位を意味する。本発明の接種物の新しい単位投与 に関する明和は、何活性物質の独特な特性及びその独自の免疫学 的効果、及び何ここで詳細に公開されている動物中での免疫学的 使用に内在する制限により説明され、かつ直接依存しており、こ れらが本発明の特徴となっている。

典型的には、接種物は、水、食塩水又はリン酸機衡食塩水などの生理学的に許容された(受容である)希釈剤中にポリペプチドー箱合体を分散させることにより、乾燥した固体のポリペプチド結合体から水性組成物を調製することができる。

また、接種物は希釈剤の一部として、アジュパントを含んでいる。完全フロイントアジュパント(CFA)、不完全フロイントアジュパント(IFA)及びミョウパンのようなアジュパントは、 当分野ではよく知られており、いくつかの会社から市販されている。

1. 抗体及び抗体組成物

推々の文法型の"抗体"という話は、イムノグロブリン分子及

びイムノグロブリン分子の免疫学的に活性な領域すなわち抗体結合部位又はバラトーブを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来のイムノグロブリン分子、真質的に本来のものと同じイムノグロブリン分子及びFab、Pab'、F (ab')。及びF(v)として、当分野で知られている領域を含む、バラトーブを含有する、イムノグロブリン分子の一部がある。

本発明の抗体組成物は、b u T F h 及び本発明の特異的ポリペプチドの少なくとも1 つと免疫反応を起こす抗体分子を含むことを特徴とする抗ペプチド抗体である。

例えば、 h u T F h 及び組織因子結合部位のポリペプラド類但物と免疫反応する抗体分子を含む、本発明の抗体組成物は組織因子が因子リンド。と結合する能力を中和できる。従って、好ましい抗体組成物は、 h u T F h 及び p 2 6 - 4 9 又は p 1 4 6 - 1 6 7 と反応し、かつ、 p 2 0 4 ~ 2 2 6 と変質的に免疫反応しない抗体分子を含むものである。 h u T F h に対して生ずるポリクローナル抗血清は、 p 2 0 4 - 2 2 6 免疫反応する抗体を含むことに注意すべきである。このように、抗 2 0 4 - 2 2 6 免疫反応性が実質的にないことが、本抗体組成物と従来の報告されているものとを区別する特性となっている。

本発明の抗体組成物の典型的生度は、水乳動物を、本発明の接種物で免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有する水乳銀抗体分子を誘導することによって行なわれる。 さらに、その抗体分子を表の水乳動物から収集し、例えば、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーのような世来技術によって、その必要量を単態する。このように生産した抗体組成物は、なかんずく、診断法及び身体サンプルにおけるカロTFカを検出するための、本発明のシステムで用いることができる。

モノクローナル抗体組放物も、本発明で考案されている。検出限界内で、モノクローナル抗体組放物は、効果的に h u T P h を結合しうる、唯一種類の抗体結合部位を含んでいる。従って、典型的に、本発明のモノクローナル抗体組成物は、それがh u T F h 以外のタンパク質を結合できる抗体をたとえ合んでいたとしても、h u T P h への結合観和性を示す。ひとつの監禁において、モノクローナル抗体組成物は、h u T F h 及び、組織因子結合部位のポリペプチド類似物、好ましくはp 2 6 ~ 4 9 又はp 1 4 6 ~ 1 5 7 と免疫反応する抗体分子を含んでいる。

他の態機において、本発明は、huTFhと免疫反応し、 huTFhにより開始する最無を阻害する抗体分子を含む抗毒無 (中和) MoAbを考案した。さらに最無を阻害する好ましい MoAbは本発明のポリペプチド、好ましくは、huTFh結合部位ポリペプチド類似物、及びさらに好ましくは、第1表で示されているポリペプチドと免疫反応することを特徴とする。

他の監視において、抗凝無 MoAbは、 h u T F h 及びhuffh: 因子切/U a の複合体と免疫反応し、 h u T F h によって開始する凝集を阻害 (中和) する抗体分子を含んでいる。さらに、好ましい抗凝集 MoAbは h u T F h ポリペプチド p 1 - 3 0 又はp26 - 4 8 と免疫反応することを特徴とし、またこれは、 h u T F h ポリペプチド p 5 6 - 7 1 と免疫反応しないことが好ましい。

また、本発明は、組織因子の凝集を開始する能力を中和しない 抗体分子を含む非中和性モノクローナル抗体組成物も考案した。 そのような組成物は、huTFh及びポリペプチドpl-30と 免疫反応し、かつ、ハイブリドーマTF9-10H10により生 産 (分泌)される抗体分子を含むことが望ましい。

本発明のモノクローナル抗体組成物は、適当なポリペプチド特

異性をもつ抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培 地を含む、モノクローナルハイブリドーマの培養を開始すること によって生度することができる。

このハイブリドーマが培地中に、その抗体分子を分泌するのに 十分な条件及び時間、培養を維持する。それから、抗体含有培地 を収集する。さらにこの抗体分子を従来法により早難する。

これらの超成物の調製に有用な培地は、当分野ではよく知られておりまた、市販されていて、合成培養培地、 四血統業建マウス及びそれに類するものが含まれている。代表的合成培地は、4.5 g/gのグルコース、20 mグルタミン及び20 Mウン胎児血清を補足した、グルベコ級小培地(DMEM:グルベコ(Dolbecco)等、ヴィロロジー(Vivol)、8 巻、396頁(1959年))である。代表的同血繁殖マウス株はBalb/eである。上述の方法で生産したモノクローナル抗体組成物は、例えば、 hu TFh 含有免疫反応の形成が必要である、診断及び治療法で用いることがで表る。

J. ハイブリドーマ

本売明のハイブリドーマは、huTFhと免疫反応する抗体分子を生度することを特徴とする。さらに、好ましいハイブリドーマは、huTFhに関始する高無を阻害し、また、望ましくは、本発明のポリペプチド、好ましくは、huTFh結合部位ポリペプチド類似物、そしてさらに好ましくは、第1支に示されているポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生度することを特徴としている。さらに好ましい結構においては、抗凝集MoAbは、非ヒト、霊品類、TIと免疫反応する。

他の好ましい態様において、本発明のハイブリドーマはhoTFh 及び h u T P h ; 因子以/U a の複合体と免疫反応し、hoT F h

Wa複合体形成速度の液少によると考えられている。従って、生体内において、huTFh因子Y/Wa特合部位ポリペプテド類像物の投与は、凝集やある炎症反応のような、超機因子の因子Y/Waへの結合により開始する生理学的応答を調動するのに用いることができる。好ましい直接において、このポリペプチドは、先に述べたように、リン野質中に分散して投与される。

生体内における組織因子による因子は/VI a の結合を講節する他の方法は、本発明の抗体組成物(抗ペプチド抗体)又は抗凝集MoAbの効果量を静脈注射により投与することである。この抗体分子は、パラトピック領域を含み、かつイムノグロブリン分所片F(ab')。、Fab及びそれに関するもののような、Fc 領域を含まないものである。治療的に効果的量の抗凝集MoAbは、体重は当り15μgから5m、好ましくは体質は当り、約100μgから約1mc、より好変しくは、体重は当り約150μgから約500μgの範囲である。

他の駐機において、本発明のMoAb、抗凝集MoAb又は非中和性MoAbの抗体分子を抗腫瘍試異に結合し、抗腫瘍治療組成物が作られる。このようにして作った、効果量の抗腫瘍治療組成物を、その表質に組織因子を発現する腫瘍細胞を有する被検者に投与することができる。このような腫瘍細胞の代表例は、胸及び肺のがん細胞である。

ここで考案された抗謀孫は双の代表例には*** 1、***Re、***Bl 及びこれに残するもののような放射性核種がある。放射性核種特 合モノクローナル抗体治療組成物の製造法及びその使用法は、コ ザック(Kozak)等(トレンズ・イン・パイオテクノロジー (Trends in Biotech.)4巻、253~264頁(1986年))

により報告されている。

により関始する恐無を中和する抗体分子を生度する。さらに、 h u T P h : 因子 W / W a の複合体と免疫反応するハイブリドー マ生産抗体は、額抗体の、 h u T F h ポリペプチドゥ1-30又 は p 26-49、 好ましくはその両方と免疫反応し、かつ、より 好ましくは、額抗体分子が、ポリトロT F h ポリペプチドゥ56 - 71とは免疫反応を起こさないことを特徴としている。

望ましい免疫特異性を有する、すなわち、特別なタンパク質をして、またはポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生理する (分泌する) ハイブリドーマの作成法は、当分野ではよく知られている。特に、ニマン (Niman) 等により報告されたハイブリドーマ技術は (プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Pvoc. Ketl. Acad. Sci.) USA、80巻、4949~4953頁(1983年))、有用である。好ましいハイブリドーマを、例13の第5長に示した。

ハイブリドーマ培養物TP8-5G9、TP9-6B4及びTP9-10月10はブタベスト協定に従がい、1987年3月27日ATCCに保管され、各4受理番号、月B9382、月B9381及び月B9383が割当てられた。

1. 治療方法及び組成物

本発明のhuTFh因子VI/VI。の結合部位ポリペプチド類似物、抗体組成物、モノクローナル抗体組成物及び抗凝集MinAbは各々、生体内において、組織因子による因子VI/VI。の結合を調整するのに用いることができる。

別えば、huTPh因子理/智。の結合部位ポリペプチド類似物は、効果量を被検者に投与したとき、因子智/智。の組織因子への結合を競争的に限等することができる、医療的に許容しうる組成物に用いることができる。この阻害は、組織因子~因子智/

投与されたボリペプチド又は抗体分子含有組成物は、溶液又はサスペンジョンの形をしているが、ボリペプチドは、錠剤、丸薬、カプセル、放出持続製剤又は粉末の形もとる。どの場合にも、この組成物は、0.10%~35%、好ましくは、25%~70%の活性成分を含んでいる。

活性成分としてポリペプチド又は抗体分子を含む治療組成物の 調製は、この分野ではよく知られている。典型的には、このよう な組成物は、液体溶液又はサスペンジョンのような注射可能な形 に調製されるが、注射的の液体溶液又はサスペンジョンを作るの に過している固体形としても調製される。またこの調製物はエマ ルジョン化されることもある。この活性治療成分は、しばしまる。 例えば、典型的賦形別としては、水、食塩水、デキスピロース、 グリセロール、エタノール又はそれらに類するもの及びこれらの 組合せたものがある。加えて、もし、望ましいなら、この組成分 は、加湿剤又はエマルジョン化剤、pI模衡剤のような、活性成分 の効果を促進する補助物質を少量含ませることも可能である。

ボリペプチド又は抗体分子組成物は、中和した医療的に受容し うる塩の形に調整することもできる。医療的に受容しうる塩には、 酸付加塩 (ポリペプチド又は抗体分子の遊離しているアミノ基で 形成される)及び、例えば、塩酸又はリン酸のような無機酸又は、 酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸及びこれら に緩するもので形成されるものがある。遊離したカルボキシル基 で形成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、 カルシウム又は鉄の水酸化物のような無機塩基及びイソプロビル アミン、トリノチルアミン、2~エチルアミノエタノ~ル、ヒス チジン、プロカイン及びこれらに類するもののような有機塩基か ら誘導される。

治療用のポリペプチド又は抗体分子含有組成物に例えば、単位 投与量の注射によるように、局所的に又は静脈注射により随便に 対象される。

本発明の治療組成物に対して用いられる。単位投与。という時 句は、ヒトに1回投与するのに通した、必要とされる常叙利、す なわち、キャリヤー又はピヒクルと共に、望ましい治療効果をあ げるために計算された、予め次められた量の活性物質を含む、物 種的に分類されている単位を実味する。

遊返成物は、投与物形状に通した方法で、治療的に効果的な量が投与される。投与される量は処置される検体、活性成分を利用する検体の血液凝集システムの容量及び望さしい組織因子結合能の阻害又は中和底に依存する。投与される必要のある活性成分の特定な量は、医師の診断に依存し、かつ、各個人によっても異なる。しかし、過当なポリペプチド投与範囲は、1日に、急者当り、1から5ミリグラムの活性物質というオーダーであり、投与の経緯に依存する。第1回投与及び二次免疫の適正な治療計画もいろいろであるが、典型的には、一次投与後、1時間以上の間隔をおいて、さらに注射又は他の方法による投与が扱り返えされる。別に、血液中、10ナノモル違度から10マイクロモル違度を維持するのに十分な、持続的静脈性入性も考案されている。1. 診断システム

本発明のキット型の診断システムは、少なくとも1回の検定に 十分な量の、分包は頭として、本発明の発現タンパク質ポリペプ チド、抗体組成物又はモノクローナル抗体組成物を含んでいる。 また、この分包試頭の使用説明書も含まれているのが普遍である。 発動的に、"使用説明書"には、試面過度には、混合する試面

イムノロジー (Scand. J. Januaol.) 8 巻、褚 版 7 老、 7 ~ 2 3 頁(1 9 7 8 年)、ロッドウェル (Rodwell) 等の、パイオテク ノロジー (Biotech.) 、3 巻、8 8 9 ~ 8 9 4 頁(1 9 8 4 年) 及び朱国特許第 4.493,795号参照。

全た、診断システムは、好ましくは分包の、特異的試策を含む。 "特異的結合試策"は、本発明の試策を選択的に結合できる分子 であるが、本発明のタンパク質発現虚物、ポリペプチド又は抗体 分子そのものではない。代表的な特異的結合試策は、抗体分子、 補体タンパク質又はその断片、タンパク質人、血液凝集因子セノ 切ュ、子カシ組織因子及びそれに類するものがある。この特異的 結合試策は、反応物が複合体の一部として存在するとき、これと 結合することが望ましい。

好ましい態機において、特異的結合試取はラベル化される。しかし、その診断システムが、ラベル化されていない特異的結合試 策を含むとき、典型的には、この試策は、増中手段又は試策として用いられる。これらの版様において、このラベル化した特異的 結合試策は、この増中手段が、反応複合有複合体に結合している とき、この増中手段に特異的に結合することができる。

本発明の診断キットは、血液、血圧又は尿のような体液サンプル中のトゥTFトの存在又は量を検出するのに。イライザ・方式で用いることができる。。イライザ性。は、サンブル中に存在する抗原又は抗体量を検出及び定量するための、固相に結合した抗体又は抗原及び酵素一抗原又は酵素一抗体結合物を用いた、酵素結合免疫吸着検定性のことである。イライザ性の段明は、全て参考としてここに超込まれている、1982年、CA州ロサンゼェルスのラング・メディカル・パブリケーションから出版された、D.P.サイツ(Sites)等の基本的及び四床的免疫学、第4編、

とサンブルの相対量、試取/サンブル混合物の維持時間、温度、パッファ条件及びそれに領するもののような、少なくとも1回の 検定法のパラメーターを明確に記述してある。

好ましい脂物において、さらに、本発明の診断システムは、飲 更を含む複合体の形成を知らせるラベル又は指示手段を含んでい x

ここで用いられているように、種々の文法型の。うべル。及び ・指示手段。は、複合体の存在を示す検出可能な信号を座み出す のに直接又は間接的に関連する単一の原子及び分子を意味する。 ・生体内。うべル又は指示手段とは、被検者の体内で有用なもの である。どのうべル又は指示手段とは、被検者の体内ではモモノクロ ーナル抗体組成物の一部である抗体分子、発現したタンパク質、 又はポリペプチドに結合又は超込まれていることもあるし、また 別々に使用されることもあり、また、これらの原子又は分子は付 加的試験と超合せて、又は早秋で使用されうる。このようなラベ ルは、臨床的診断化学においては、よく知られているものであり、 それらが、他の新しいタンパク質、大発明の一部を持成する。

ラベルの結合、すなわち、ポリペプチド及びタンパク質のラベル化は、当分野ではよく知られている。例えば、ハイブリドーマによって生産される抗体分子は、培養培地中の成分として与えられたとき、放射性同位元素含有アミノ酸の代謝的取込みによるラベル化が可能である。例えば、ガルフレ (Ga)fre) 等の、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Meth. Eozyaol.) 73巻、3~46頁(1981年) 分類。活性化官能基を介するタンパク質の結合又はカップリング技術は特に有用である。例えば、オーラメアス (Auranema) 等の、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・

第22章及び米国特許第3,654,090号、第3,850,752号及び第4,016,043号に報告されている。

このように、好ましい結構において、本発明の発現したタンパク質、ポリペプチド又は抗体は固相マトリックスに固定され、この体がシステム中に、分包されている固体サポートを形作っている。

典型的に、この試策の固体マトリックスの固定は、他の固定法 もあるが、この分野でよく知られている水性媒体からの吸着が用 いられている。

有用な固体マトリックスは、当分野でよく知られている。このような物質には、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社(NJ州、ピスカタウェイ)から、セファデックスという登録陶理で市販されている、気機デキストラン;アガロース;IL州、北シカゴ、アポット・ラボラトリーズ社から市販されている直径約1ミクロン〜約5ミリメートルのポリスチレンピーズ;シート状、ヒモ状又はへう状のポリ塩化ビニルポリスチレン、無機ポリアクリルアミド、ニトロセルロース又はナイロンペースの締物、又は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニルでできているチューブ、プレート又はマイクロプレートのウェルが含まれる。

ここで述べられているは断システムの状策、ラベル化結合状策 又は、増中試策は、液体分散物として溶液として、又は、例えば、 凍結乾燥型のような、実質的に乾燥粉として提供される。指示手 段が酵素である場合、この酵素基質も、システムの別の包むに提 供される。先に述べた、マイクロプレートのような固体サポート 及び1つ以上のパッファも、この診断検定システム中に別にパッケージされた要素として含まれている。

診断システムに関連して、ここで錯論されているパッケージは、

診断システムにおいて通常使われるものである。このようなパッケージには、ガラス及びプラスチック型の(例えば、ポリエテレン、ポリプロピレン及びポリカーポネート)ポトル、パイアル、プラステック及びプラステックホイルでラミネートした外袋物及びこれらに類するものが含まれている。

n. 检定法

本発明は、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物中に含まれている。発現されたタンパク質、ポリペプチド又は抗体分子を含む複合体を生産することにより h n T F h を検出する方法を考案した。 当業者には、これらの複合体を形成するのに利用できる多くの、よく知られている臨床的診断の化学手段があることが理解できよう。 従って、典型的検定方法がここで説明されているが、これは、本発明を制限するものではない。

1. 血柱独出

被検者中に存在する血栓検出生が考案された。生体内での指示手段と結合する抗体を含む本発明の、効果的量のモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈性射する。好ましい臓様において、ラベル化した抗体は、huTFh及び第1表及び第2表のポリペプチドと免疫反応するがp204~226とは反応しないもので、好ましくはハイブリドーマTF8-5G9、TF9-6B4又はTF9-10H10から生産されたものである。

それから被検者を、ラベル化した抗体分子が、血栓の一部に存在するhuTFhと反応し、複合体を作るのに十分な決められた時間、及び、好ましくは、未反応の抗体分子が体内から一掃されるのに十分な付加的時間維持する。その後、被検者を、生成した複合体の存否及び好ましくはその位置について検定する。

2.写体サンブル中のカロTFhの検出

ートした。

その後、残留脳組織固体を各々、その固体をヘプタン: ブタノール (2:1) 25ミリリットル (al) 当り、組織関体1gの 割で、ヘプタン: ブタノール (2:1) と混合することによって 行う5回の抽出を行ない、ついて減過により、その固体を回収する。最後の減過後、残留脳組織固体を再び大気圧下、約20で一 晩で乾燥し、脱脂脳組織粉末を作り、必要になるまで、-80で に保存する。

つづいて、福組機粉末 2 5 グラムをTS/EDTAパッファ (100 ミリモル漆度 (mM) NaC & 、50 mMトリス・塩酸 (せ7.5)、0.02 % アジ化ナトリウム、5 mMエチレンジアミン四 mp 酸 (EDTA)、0.1 % (V/V) トリトンX-100 (ポリアリルエチレン・3-オクチルフェニルエーテル)) 500 m & と混合し、ついで 4 でで一晩複神する。さらにこの混合物を15,300×gで1時間達心する。生じたベレットを500 m & のパッファA (100 m M Mac & 、50 m M トリス・塩酸 (p87.5)、0.02 % アジ化ナトリウム、2 % トリトンX-100) に再整濁し、スラリーを作る。 室温で1時間の微神後、このスラリーを上述のように達心する。生じた上滑を回収し、液結乾燥した後、100 m & のパッファ A に溶かして、 h u T F h 含有脂抽出溶液を作る。

2. huTFの森血活性を測定するための葡萄枝定法

A α T F プロコアグラント活性を、 \$ 7 ℃に複粋した、全域策及び混合物を用いて行う、 1 股階級集技定法で規定した。血無と関容積の、 2 0 m M クエン酸ナトリウム 2 水和物及び 1 4 0 m M MaC & (p87.4) を含む溶液を混合することにより、正常なヒト血漿をクエン酸化した。 T B S / B S A 溶液 (150 m M Pac & 、

身体サンプル、好ましくは体被サンプル中のカロ丁Fトの存在、及び好ましくはその貴を検出するため、競合的又は非競合的な、健々の不均一及び均一検定性が利用できる。例えば、液体体被サンプルと、ラベル化したp26-49を、マイクロブレートのウェルの内壁に固定した、ハイブリドーマ丁F8-5G9又は丁F9-10H10から生産された抗体分子を含む固体サポートと混合し、固複相免疫反応混合物を作る。この混合物をサンプル中に存在するカロ丁Fト及びラベル化したp26-49が、固体サポートとして存在する抗体分子への結合を競争し、固相免疫反応度物を形成するのに十分な時間、生物学的検定条件下に維持する。未結合のラベル化p26-49の量を例定し、その差により、カロ丁Fトの存在を検定できる。例

次に示す例は、本発明の説明を意図したもので、これを制限するものではない。

1. 組織因子合有ヒト屋抽出物の講整

生枝で得られた正常なヒトの脳を12時間以内に処理するかもしくは、-80でに保存する。その強膜及び大脳を除き、ついて 残存する脳部分を、ポリトロンホモジナイザー (NY、ウェストパリー、ブリンクマン、インスツラメント社)を用いて、等容量の冷(0で)アセトン中でホモジネートした。このホモジネートしたものをさらに3倍容の冷アセトンと混合し、その組織固体を 分を、焼結ガラスロートを用いて進過して回収した。各々7回の 2倍容の冷アセトンとの混合及び引きつづく旋通により、残留す 体からアセトン可得性物質を抽出した。最後の減過の後、残容す るアセトンを、20で、一晩、残留固体から大気圧下でメポレ

50mMトリス・8C & (p87.5)、0.1%子ウシ血情アルブミン)で希釈したhuTFを含むサンプル100マイクロリットルを、100μ&のクエン酸化血漿と混合した。25mMCaC & 神被100μ&を混合し、妥集反応混合物を作り、募集が始まるまでゆっくりと揺らした。CaC & 。添加と、森血形成の間の時間を倒定した。それから、huTF活性の復準曲線を、砂で示した凝集時間と希釈率をプロットすることにより作った。代表的領準曲線を第3回に示した。

3. huTFの製和性単離のための、因子で含有固体サポートの 短繋

ヒトの因子 W / W a を参考文献として組込まれている、フェア (Pair) の報告 (ブラッド (Blood)、62 巻、784~91 頁 (1983年)) に従って早難した。この早難した因子 W / W a を、アガロース固体マトリックスに結合するため、4 でで一晩、その5 ミリグラム (ng) を、0.1 M 2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸 (M E S) (pH 6.5) に対して透析した。塩化カルシウムを最終復度 1 = M となるように添加した。それから因子 「 W a を 4 n g の アファゲルー 15 活性化 アガロースピーズ (C A 州、リッチモンド、バイオラド・ラボラトリーズ社) と混合し、生じた結合反応混合物を、製造業者が接触するもの (バイオラド) に従って 4 で、4 時間の 回転処理を行った。

固体サポート上の過剰タンパク質結合部位を、その固体サポートを、0.1 Mグリシンエチルエステル中、塩温で1時間費押することにより、ブロックした。その後、この固体サポートを、焼結ガラスロート上各約20mlの(D)パッファA、(201 M NaC & 合有パッファA、(205 m M EDTA合有パッファA及び(4)1 m M CaC & ま有パッファAをごの順序で用いて洗浄した。それか

ら週剰の根件を滅圧下で除き、半乾燥状の粒子物質 (ケーキ) を作った。

4.h u T P の因子VI / VI 観和性による単離

0.1 Mのグリシンエチルエステル及び 0.1 M MES(pH 6.5) を含む 20 m 8 の得液を、 2 2.5 m 8 のアフィゲルー 1 5 アガロースピーズ (バイオラド) と混合し、結合反応混合物を作る。この結合反応混合物を定温に 1 時間維持する。この生成した結合物を、焼結ガラスロート上、 1 0 倍容のパッファ 1 を用い、減圧下で維通することにより洗浄し、グリシンエチルエステルーアガロースケー半を作る。

例1で複製した30m4の脳抽出溶液を、1mM塩化カルシウムを含む6リットルのパッファAに対し、4で、1 残透折を行う。 透析した脳抽出物を、グリシンエチルエステルーアガロースケーキと混合し、固被相反応混合物を作る。回転しながら室温で2時間維持した後、この固液相を規格ガラスロートを用いて減過することで分離する。この液相を回収し、最終温度m45岁10ユニットとなるようにトラシロール(MOH、セントルイス、シグマケミカル社、アプロチェン)と混合する。この回収した液相を例3で調製した因子吸/%a/アガロースケーキと混合し、第2の固/独相混合物を作る。

この混合物を回転しながら、一晩4でに維持し、huTF-因子U/VIa合有固相度物を形成させる。その後、この固相及び被相を先に述べたように該当により分離する。焼結ガラスロート上に残留物する固相を1mM塩化カルシウムを含むパッファA25mAで洗浄した。さらに、この固相を焼結ガラスクロマトグラフィーカラム(0.5×15cm、パイオラド)に移し、6mAの同洗浄パッファで洗浄した。上記の洗浄法、この固はサポートに結合

した h u T P モ、焼結ガラスカラム上に保持されている固体サポートを 5 mMの B D T A を含むパッファ A で洗やすることにより、波鷲 (溶出) させる。溶出した物質を 1 m 2 m分づつ回収し、各 画分について、例 2 で述べた方法により、 h u T P の存否を検定した。 h u T P 含有面分を無め、 4 でで、 1 ¼ トリトンX - 100 を含む 6 リットルの T B S (1 5 0 m M N m C 2 、 1 5 0 m M トリス塩酸、 p H 7.5) に対して 1 製造折した。

このようにして作った透析物をつづいて、4倍容の冷アセトンと複合し、huTFタンパク質を比較した。この沈疑をおよそー10で、5000×8、30分間の遠心で振めた。生成したペレットを質素雰囲気下で覚燥した。典型的な収量は、脱離した脳退機粉束1グラム(乾燥重量)当り、2μ8のhuTPであった。

このようにして生じた早間 h u T F サンブルをT B S / トリトン中に思源し、ついで、製造業者の指示に従がい(1 L 、ロックフォード、ピアス・ケミカル社)、ロードゲンを用い、Na ***1でうべル化した(1 L 州、アーリントンハイツ、アマーシャム社、マイクログラム当り 1 6 マイクロキューリ)。ラベル化後、通動の未反応***1をT B S / トリトンを用いたセファデックス G 25 (N J。ピスカタウィイ、ファルマシア社)での股塩クロマトグラフィーにより、ラベル化した h u T F から分離した。

*** 1 ラベル化 N u T F 含有サンブルのラウリル装設ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動による (SDS-PAGE) 評価は、レムリ (Laemali) (ネイチャー (Wature) 、 2 2 7 他、6 8 0 ~ 6 8 5 頁 (1 9 7 0 年)) の方法に従った。還元条件下で評価するサンブルに対しては、1 0 0 mMのジチオスレイトールを、サンブルバッファ中に含有させた。1 %トリトンX-100、5 0 mM トリス塩酸 (pH 7.4)、1 5 0 mM NaC & 中の138 I

AuTPを、10分の1容のTP8-5G9又はPAb100 (ATCC-TIB115;ここで本がティブコントロールとして用いられているSV40ラージT抗原特異的抗体を生産するハイブリドーマ) ハイブリドーマ特委上滑とともに、4でで1晩インキュペートすることにより免疫性配化を行った。アガロースピーズ (MO州、セントルイス、シグマ・ケミカル社)上に固定したヤギの抗マウス1gGを、その 第1次免疫反応産物を吸収するのに用いた。このビーズを同パッファでよく洗浄し、結合した***1-huTPを、DTT存在下又は非存在下、同パッファ中で5分間煮沸することにより溶出した。SDS-PAGE後、タンパク質パンドはオートフルオログラフィーで可摂化した。

単離した h u TFを放射性ロウ素化し、DTTで運元し、ついで 1 0 % アクリルアミドゲルで SDS-PAGE分析したとき、4 7 k ダルトンの見かけの分子量をもつ単一のメインパンドが観察された(第 4 図)。しかし、未運元の h u TFを同様に分析した場合は、およそ 5 8 及び 4 7 k D a の 2 つのパンドが相対的に等しい量で観察され(第 5 図レーンB)、このことは、少なくとも 2 つの異なる多きさのものの存在を示している。

非運元で観察されるこの2つのパンドに対する説明としては、その大きな方、すなわち、泳動が遅いパンドは、非常に多くのグリコシル化を受けたものか、付加的なプロセッシングを受けていないタンパク質を有しているのか、又は、付加的な、ジスルフィド結合で結合したポリペプチドと会合しているのかもしれないというものである。還元後の単一パンドの存在は、はじめの2つの示唆と一致している。その後者の可能性は中でも一番大きいように思えるが、その小さいサイズの差のために、付加的ポリペプチド貸は、色素の場所又はその付近に泳動するような十分小さいも

のらしく、運元後、10%アクリルアミドでは分離されないので あろう。15%のポリアクリルアミドゲルの選元及び非選兄heIP の電気泳動は、単一の分離した軽額を示すのには失敗したが、い くつかの少量の、速く泳動するパンドが観察された(第5図、レ ·一ンA及びB)。これらの小さい、少量の求りペプチドは、以前 に報告されているように(ブローズ (Broze)) 筝、ジャーナル・ オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 、250 巻:10817~20頁(1985年)及びグハ (Guha) 等、プ ロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエ ンス (Proc. Hatl. Acad. Sci.) USA、83巻、299~302 頁(1986年))、汚換物を示している。この可能性を明らか にするため、 4 7 kDa 及び 5 8 kDa のパンドは非還元ゲルか ら切り出され、その各々を、ジチオスレイトールで運元し、その 各ャを、15%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEに かけた(第5回、レーンC及びD)。581Dタンパク質は125 kD経収及び47kDe 煮鉄であると分った。47kDa のタンパ ク質を分析したとき、匈分子量の重鎮のみが観察された。このよ うに、阿者は、SDS-PAGEで間接の導動をもつ重信を保有 していた。

直接軽額の存在を示すため、「・・」ートuTPを、トuTP特異的モノクローナル抗体TP8-5G9で免疫状酸化し、それを還元剤存在下の電気泳動にかけた。主要なも7kDa パンドがおよそ、125kDa の分離したパンドとともに観察された(第6 図、レーンA)。 遠元化しないサンアルの電気泳動でおよそも7kDa 及び58kD。 のパンドを生じたが、低い分子量のポリペプチドは生じなかった(第6図、レーンB)。また非遺元トuTPの電気泳動は、ブローズ (Broze)等(ジャーナル・オブ・パイオ

ロジカル・ケミストリー(J. Biol. Cham.) 、260巻:10917 ~20頁(1985年))により示唆されているカロTF重領のダイマーと一致する、少量の90kDa タンパク質も示した。

huTP軽額が怠譲からタンパク質の分解によって生するという可能性を研究するため、SDS-PAGEにより単階した軽額及び重額を、N来端アミノ設配列分析にかけた。

重額及び軽額をSDS-PAGEで分離し、アパーソールド (Abersold)等の高pH法(ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Ches.)、261巻、4225~4238 質(1986年))を用い、活性化した、アミノ被理ファイパーガラスフィルター上に電気プロットした。このタンパク質パンドを、蛍光染料(アパーソールド(Abersold)等、上記)により、このプロットを可視化し、切り出し、そして、まだファイパーガラスに結合したまま、PTH読導体のオン・ラインHPLC分析を用いたアプライド・パイオシステムズ470Aタンパク質シークエンサーで配列決定した。別にタンパク質パンドをコマージ・ブルーによる染色によりゲルを可視化し、シークエンシングのために、電気滑出した。両方法とも等しい結果を与えた。

トロ丁F重複のマイクロシークエンシングは、ほぼ等モル量のアミノ政配列で一致した結果となった。ほとんど全ての場合、各アミノ政務器は2サイクル離れて、2度出現する。これは、長さがN末浦で2残基異なるトロ丁F貫賀の2つのパリアントがねじれたN末端をもつことの羽白な証拠である。大きい方のパリアントのN末端は、非特定のアミノ政Xを含む

Ser-Gly-X-X-Asp-Thr-Val-Ala-Ala-Tyr-X-Leu-Thr-Trp-Lys-ser であることが誘導された。

鞋鎖の配列決定するいくつかの試みは、プロックされたN末端

と一致して、なんら配列の情報を与えなかった。しかし、hetPの重複及び軽額は、単離されたhuTFに対して生じた、2つのウサギの抗huTF抗血清及び28個の、マウスモノクローナル抗体の全でが、重複のみに結合することが分っていることから、抗原的に全く別のものである。それゆえ、軽額は、重額のタンパク質分解断片とは考えにくい。さらに軽額は、ペーター。3クログロブリンに対する抗血清とは反応しなかった。

現在、12.5kDのAuTF軽額の意味は知られていない。それは、単一の、独立した分子類なので、ランダムなジスルフィド
交換による、単離の際にアーティファクトとして誘導されたものでもないようだ。遠元なしに、現和性による単類を行ったhuTFをSDS-PAGEにかけたとき、huTF活性は、58kDoと47kDaの分子量に対応するゲルから溶出した。これら2つの分子量に対応するhuTF活性も、想脳又は部分的に単層した胎型の抽出物を、SDSゲルの電気泳動にかけたとき(データ示きず)も検出された。全ての場合において、その活性は、因子では存て、このことは、huTF特異的活性を示している。これらの知見は、huTFのみが因子はを活性化でき、かつ、軽額はこの類能に必要ないことを示している。

軽額がトuTF重額のおよそ半分のみにジスルフィド結合していることは興味深い。生体内で、トuTFの重要な領域に不在なのか、存在するのかとは別に、昇面活性剤で分解される、非共有的相互作用を介して金合しているのであろう。軽額は、サイズが小さく、SDSーPAGEの際にマーカー色素の部分に決動してしまうため、また、トuTFの報告されている分析例が運元後行なわれていることから、初期の研究では気づかれなかった。現行の観和性を用いた方法で単離することができる制限された量では、

タンパク質染色によって、会合した小ポリペプチド額を検出する ことは困難である。

イン・ビトロでは、単量体トロTFが凝集を開始するにもかかわらず、トロTFによる凝集の生理的開始は、細胞表面で起こる。 軽額は、直接的凝集検定性で検出することができる、トロTF機能又は機構において重要な役割をはたしていることが推察できるであろう。例えば、軽額は、因子リノロコの組織因子への結合の正の議詞性を説明すると仮定されてきている、因子以に対する2つのサブユニットレセプターのアッセンブリーに関与している可能性がある。別に、細胞表面上の構造ドメインでのトロTFの機構及び、細胞表面上でのトロTF活性の制御は、トロTF経験に仲介されるのかもしれない。

N結合オリゴ糖の役割は、***1 ー h u T F サンブルの脱ゲルコシル化により試験した。 無分およそ3.6 × 1 0 * カウントを含む、ラベル化 h u T F 約 1 2.7 4 ナノグラムを 0.4 ユニットのグリコペプチダーゼ F (1 N 州、インディアナボリス、ベーリンガー、マンハイム・パイオケミカルス社)、 2 0 m M トリス塩酸(p H 7.5)、 1 0 m M E D T A、及び 1 メトリトン×-100を含む 2 0 μ 2 の容液と混合し、 3 7 でに 1 6 時間維持した。 それから、この脱グリコシル化した度物を、先に述べた S D S ー P A G E で分析した。

第7図、レーン 4 及び 5 に示した、脱グリコシル化の研究結果 は、 5 8 k D a の h u T P は、別のタンパク質部分、すなわち軽 額の存在のため、 4 7 k D a のものよりも、高い相対分子量を示 すことを表わしている。

このようにして早難した AuTPを、再脂質化し、そのプロコ アグラント活性が再換成された。最高の活性を有する再脂質化組 成因子康物を提供するのに必要な組織因子: 脂質比が、0.1 %BSAを含むHBSパッファ溶液(2.0 mMへペス、 pH 6.0、14.0 mM No C & 、0.0 1 % アジ化ナトリウム)中、 機々の復度となるように、上述の得られた単離 h u T F を溶かすことにより実験的に測定された。 それから、 様々 h u T F 格駅物を以下に述べるように再脂質化し、さらに、例2で轉告されている軽無検定性で測定された、最も高い活性を示す比が、後の使用のために 地値された。

ト u T F の再賠質化のための賠責は、M O 州、セントルイス、シグマケミカル社から入手できるウサギの福下セトン抽出粉末から抽出することにより調製した。この粉末を、粉末1 g に対し、25 o g のヘブタン:ブタノール(2:1、 v / v)の割でヘブタン:ブタノールと混合し、ついでこれに含まれる固体を挽精がラスロートを用いた濾過により回収した。残留固体について、この抽出を6回くり返した。さらに、この残留固体をロト・エバボレーションで乾燥し、クロロホルムに溶解後、-80でに保存した。必要なときに、そのクロロホルムに溶解した固体を資素雰囲気下で乾燥し、新しく個製した0.25%のデオキシコール酸ナトリウム溶液中、4 n g / n g となるように溶解し、ウサギ指リン脂質溶液(P B P L)を作った。

再勝貫化には、各huTF将駅物 I 0 0 μ ℓ を、1 0 0 μ ℓ の R B P L 溶液、0.7 6 m ℓ の 1 % ウシ血液 アルブミンモ含む H B S 溶液 (H B S / B S A) 及び 4 0 μ ℓ の 1 0 0 m M 塩化カドミウムと混合する。この混合物を 2 時間、3 7 τに維持し、ついて、ここに含まれる h α T F 活性を、例 2 で述べた 凝集検定法で測定した。

5. ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の作成

全てのハイブリドーマは、6~8週間の年令の、スクリアス・ クリニック・アンド・リーサーチ・インスチチュート、動物飼育 場から入手できるメスのBalb/cマウス由来の脾尿細胞を用いて作 成された。

a.マウスTF8の免疫化

最初の注射から、約4週間後、0.1mg生理食塩水中33μgの現和性単離化カロTFを、0.1mgの完全フロイント・アジェパント (cPA) と混合し、エマルジョンを作り、これをマウスTF8に腹腔内性射をした。

最初の接種から8週間後、リン酸緩衝食塩水中15μgの観和

ム・パイオケミカルズ)をイムロン・96欠フレキシブル・ピニルマイクロプレートのウェルに入れた。それからこのプレートを、1時間、37℃を維持し、J&Gをウェルの型に吸着させた。 TBSで3回洗浄した後、3%オパルミンを含む100μ2の TBSントリトンを各ウェルに入れ、過剰のタンパク質結合部位をブロックした。

ウェルを、1時間、約20℃に競技したのち、そのプロッキング接流を、アスピレータで除いた。そして、各ウェルに50μgのハイブリドーマ培養上滑を加えた。できた固被相免疫反応混合物を1時間、37℃に維持した。その後ウェルをTBSで3回洗冷し、過剰の彼は、アスピレータで除いた。

例4で調製した、TBS/トリトン中、およそ1mgのカuTFと、およそ5×10°cppを合む、50pgの10°1ラベル化カuTFを各ウェルに入れ、第2の固液相免疫反応混合物を作った。そのウェルをTBS/トリトンで3回洗浄し、固相に結合した '**1-トuTF含有免疫反応癌物を単離した。過剰の嵌件はアスピレータで除き、ウェルを乾燥させた。個々のウェルを切り難し、各ウェルに含まれる'**1を、ガンマカウンタで計較した。

パックグランド放射器性(huTFと抗体の反応無しの場合)はウェル当り、平均約200~300cpmであったが、一方、huTFと抗体の反応が有る場合は、ウェル当り10000cpmのカウントがある。抗huTF抗体の生度が正と検定されたハイブリドーマを退択し、本発明のハイブリドーマとした。つづいて、これらのハイブリドーマを、以下に述べるドット・ブロット検定でスクリーニングした。

b. ドット・ブロット・イライザ法

例 4 で調製した、アセトン比較した h a T F を、 4 : 1 (v/v)

性単離化トu TFを静原注射(1. v.) し、関じトu TF/ PBS接触を2(時間数にも行った。そのマウスTF8の距離版 を融合のため3日後に採取した。

b. マウスTF9の免疫化

マウスTP9は、2回のリビ・アジュバント注射に、エマルジョン化前に変性したhuTFを用いること以外は、マウスTP8と同じ接種スケジュールがほどこされた。さらに、第1回目のPBS接種の頭腔内注射をCFA合有接種後4ケ月半後に行なった。

c. ハイブリドーマの作成

TF8及びTP9由来の評細胞に、同じ融合操作を行った。各マウス由来の評細胞的 1×10° 値を、30% ポリエチレングルコール (PEG4000、ATCC25322-68-3) を含む200×2の融合媒体中、2×10° のP3X63A88,653.1ミエローマ細胞と混合した。細胞融合後、生じたハイブリドーマを96欠プレートに植種し、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチモジン)中で培養し、つづいて、huTFと反応する資体分子生産能でスクリーニングした。

同マウスTF8及びTF9弾相助由来の融合体共、HAT融合 媒体耐性ハイブリドーマ相加クローンを生じた。TF8融合体は 907個のHAT耐性ハイブリドーマを、一方TF9融合体は、 348個のHAT耐性ハイブリドーマを生じた。

- 6. 抗ねップド抗体分子の生産によるハイブリドーマのスクリーニング
- a、面相RJA

TBS中、20με/maに発釈した100μaのヤギ試マウス1mG(1N州、インデアナポリス、ベーリンガー・マンハイ

のアセトン:水溶液で抽出した。残存する状況をTBS中に20 PBブッルとなるように整想した。このAuTP溶液20pg (1pg) を、精えないインクで、BAB3ニトロセルロース紙 (シェレイチャー・アンド・シュエル、NH州、キーン)上に書いた数字の頃にスポットする。スポットしたAuTPを空気乾燥 し、個々のスポットをパンチを用いて、ディスクに切り出す。個 々のディスクを、BLOTTO(ジョンソン(Johnson)等、ジェ ネッティック・アナリティカル・テクニック(Gase、Anal、Tech.) 1巻、3頁(1984年))を含む、多穴トレイの個々のウェル に浸し、約1時間、37℃に維持した。

このBLOTTOを、ウェルからアスピレータで味き、各ウェルに、200gをのハイブリドーマ培養上清を加えた。さらにこのウェルを2時間、37でに保ち、その後、このペーパーディスクを、TBSで2回洗浄し、ウェルから取り出し、TBSにより、さらに洗浄するため、1つの大きな容器に入れた。ついで、過剰の液体をその容器から除去する。

プロトブロット試頭キットの(MI州、アン・アーパー、プロメガバイオテク社)アルカリホスファターゼ結合抗マウス I * G を、BLOTTOで 5 7 0 0 倍に粉釈し、このペーパーディスクと接触させた。このプロトブロット溶液との接触を、3 7 で3 0 分間保った。その後、ペーパーディスクを、TBS中で3 回洗浄した。乗者の指示に従い、プロトブロットキット中に含まれている発色物質により、ディスク上に結合したアルカリホスファターゼが検出される。

c. ウェスタン・プロット検定法

ウェスタン・ブロット技定のため、例 4 で報告したように単類 した約1 0 p 4 の h u T F をサンプルパッファ (2 M S D S 、

特表平1-503438 (20)

5 0mMジチオスレイトール、10%グリセリン)に溶かし、5 分間、意識した。それから、これを、レムリ (Laemali)により軽 告された(ネイチャー (Matore) 、226巻、680頁 (1970 年))、参考としてここに超込まれている、予め数色された分子 貴種準の小さい両側のレーンの間の広いレーンに試料をロードす る、分取型のスラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲ ル電気泳動にかけた(分子量標準:MA州、ニュートシセンター、 ディパーシファアイド・パイオテク社)。参考としてここに組込 まれている、トウピン(Towbin)等(プロシーディング・イン・ナ ショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Fatl. Acad. Sic.) USA, 7 6 巻、 4 3 5 0 質(1 9 7 9))により報告されて いるように、電気泳動及びニトロセルロースへの電気ブロッティ ング後、このブロットを、TBS中の5%放駐粉乳溶液でプロッ クレ、マニホルドに固定した(M A 州、ケンブリッジ、イムネチ クス社、ミニブロック)。 8 個のハイブリアーマ細胞培養上液の ストックを、各マニホルドスロットにロードし、37セで1時間 インキュペートした後、このブロットを取り除き、TBSで洗浄 した(0.02%アジ化ナトリウム会有TBS)。抗体が結合した レーンを、発色物質で発色させたアルカリネスファターゼを結合 した第2抗体を用い、供給業者の推める方法に従って可視化した (W1州、マジソン、プロメガバオテク、プロトブロット)。降 性のストック由来の培養上清を、5%放脂初乳TBSによる8倍 希釈物について、別個に再テストし、抗TF抗体を生産する個々 のハイブリドーマクローンの同定を行った。

抗トロTF抗体度生が正と判断されたハイブリドーマをさらに 特徴づけるために選択した。例えば、上記のTF8融合体由来の ハイブリドーマは、例6トで述べられているドット・ブロット検

5 G 9 モノクローナル抗体 1 0 mgの遠折により、活性化した。活性化したTF8-5 G 9 を、2 mgのアフィゲルー 1 0 アガロースピーズ (バイオラド) と混合し、できたカップリング反応混合物を、製造業者の指示に従がい処理して、TF8-5 G 9 / アガロース団体サポートを作った。

それから、例3で報告したように、固体サポート上の過剰のタンパク質結合部位をプロックし、洗浄後、彼圧維退して、TP8-5G9/アガロースケーキを作った。

S. hu丁Pの免疫競和性による単語

ヒトの疑のおよそ半分、すなわち約100mmに等しい、例1で掲載した脳拡出溶液を、計68のパッファAに対し、2回の外液交換をしつつ、4でで3日間透析した。その透析した拍出物を1.5時間、10.000×gで速心した。できた上清を、例4で調製したグリシンエチルエステルーアガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら、2時間変温に維持したのち、その固相と被相を流結ガラスロートによる速過で分離した。そのカロアと有液相を回収し、例8で調製したアド8-509/アガロースケーキと混合し、個/液相免疫反応進合物を作った。

この免疫反応復合物を、回転しながら一晩、4 でに保ち、組織因子含有固相免疫反応度物を形成させた。それから、この固相及び液相を先に述べたように健遇で分離した。固相が残留し、これを10倍容のパッファAで洗浄した。その後、固相をガラスクロマトグラフィーカラムに移し、順次、001%トリトンX-100を含む2倍容の1M Noc & 及び001%トリトンX-100を含む2倍容の0.1Mグリシン(pH4.0)で洗った。

上述の洗浄後、その固体サポートに免疫学的に結合している ね u T F 、その固体サポートを、焼結ガラスロート上に保持した 定独及び例6 c で述べられているウェスタンプロット快定法で れ u T F との免疫反応を、そのハイブリドーマ培養上情が示す ならば、抗huff抗体 座生ハイブリドーマ培養と特徴づけられる。これらの特徴は、24個のT F 9ハイブリドーマ細胞系列について みられ、そのほとんどは、例13の第5表に示した。その他のスクリーニング法で選択したハイブリドーマにより 塵生される抗体分子は (1) 即毎 散を独自の融合体に提供する免疫化マウス (すなわち T F 8 又は T F 9)、及び、独特の H A T 培地耐性ハイブリドーマ細胞が単離される、96 大培養プレート、残毒号及びウェルを号を示す文字によって呼ばれる(すなわち、5月7、11 D 12、その他)。特殊な意味の文字は、1語、ハイフン語又は 2 符として、ここにリストされる。例えば次の文字は同じモノクローナル抗体分子組成を意味している; T F 8 - 5 G 9 及び T F 8 - 5 G 9 及び T F 8 - 5 G 9 & T F 8 - 5

7. イムノグロブリンIgGの単離

イムノグロブリンIEGは、製造業者の指示に従がい、パイオラドラボラトリーズMAPSIシステムを用い、マウスのハイブリドーマ細胞系列TF8-5G9 (ATCC第HB9382号)を含むマウスの腹水液から単離される。単離しだ「EGのタンパク質速度は、製造集者の説明書に従がい、BCAタンパク質検定は現(ピアスケミカル社)を用いて測定した。

8. h u T F の免疫観和性による単離のための、抗 h u T P 含有 画体サポートの顕聲

抗 h u T P 抗体を、アガロース固体マトリックスへカップリングするため、少なくとも1回透析被交換を行う、0.1 M M E S、p H 6.5 を含む500 e A の透析パッファに対する、4 で、16時間の、例7で報告したように調製した、M A P S 単離 T P 8 -

まま、Q1Mグリシン、 pH2.5及び1%トリトンX-100溶液20m4で洗浄することにより、開放 (溶出) した。それから、例4に全て述べたように、溶出物質を回収し、huTP検定を行ない、集めて透析した。

透析物を4倍容の冷アセトンと混合し、AuTFタンパク質を 沈殿化した。さらにこの沈殿をおよそ-10で、5,000×8、 30分の違心で無めた。生成したペレットを重素雰囲気下で乾燥 し、そのペレットの一部を変性条件でのSDS-ポリアクリルア ミドゲル電気泳動で分析した(SDS-РAGE)。

解8図に示したこの分析結果は、huTFが免疫種和性により、 競脂指粉末1グラム当り、 5 SagのhuTFの収率で単型される ことを示している。

10. 抗トロTF抗体による凝集の阻害

10 p g のハイブリドーマ培養上津を、例4で調製した約2 pg の英語質化 h u T F を含む 9 0 p g の H B S N B S A と混合した。このようにして作った免疫反応混合物を 3 0 分間 3 7 t に保ち、抗 h u T F 抗体分子を免疫学的に h u T F に結合させ、免疫反応度物を形成させた。つづいて、この免疫反応混合物について、例2 で派べたように、 h u T F のプロコアグラント 活性を検定した。ネガティブ・コントロールとして、無関係の 1 g C 調製物を抗 h u T F 抗体の代りに用いた。

効果的 h u T F 速度は、インヒビターの存在下測定した 最直時間を用い、例 2 のように作った模準曲線から外挿した。 陌客は、用いた実際の h u T F 速度について、効果的 h u T F 速度の比率として表わされる。少なくとも 5 0 パーセントの阻容をするモノクローナル抗体分子類製物は、本発明の抗体分子成分を中和するものとして選択された。

例 5 に述べたように、単離した h u TF に対して生じたハイブ リドーマ由来の数多い均乗上済を、森無陽始を阻害する能力につ いて、先の操作により測定した。有意に凝集を阻害することが分 ったハイブリドーマを、第 5 変に示した。

また、流入 u T F 抗体による凝無固容は、予め形成されたholf - 因子 W 複合体を用いて行った。例 4 で 四型した再設質化した れ u T F 1 nsを含む 1 0 psを、 H B S / B S A 7 0 ps、 2 0 m M 塩化カルシウム 1 0 ps 及び、例 3 で 述べられているように 四型した因子的 2 5 nsを含む 1 0 ps と混合する。この混合物を 1 5 分間 3 7 でに保ち、 h u T F を、進合物として使える因子 V と複合体をつくらせる。その後、 1 0 ps の溶液に、例 7 で 述べたように 四型した M A P S - 単型化モノクローナル抗体約 1 0 ns を混合し、この第 2 の混合物を、 3 0 分間 3 7 でに保った。 さらに、第 1 に 2 0 m M 塩化カルシウム 1 0 0 ps のいて、ヒトのクエン酸化血張又は例 1 2 で 述べてように 四型した 因子 V で 表わされた 桑血時間を 観測することにより、生成した 混合物の 凝集阻害の 例定を行った。例 1 0 で 述べられているように、阻害率を 表わし、テめ 形成した h u T P - 因子 V は 合体での 阻害の 結果を、第 6 m 表に示した。

第 6 골

抗カロTFによるカロTF-因子ほ依存の凝集阻害 1、クエン酸化ヒト血器による器無

抗 件	因子以,	阻害率
ブランク*	+	. 0
TT 8 5 G 9 ?	+	5 8 %
コントロール・	+	0
TF8569	_	R 2 W

ここで使用されている種々のhuTFh領域に対応するポリペプチドをハゲンメイヤー(Bagenwaler)等(ポップーセイラーズ(Boppe-Seyler'a) Z。フィジオロジカル・ケミストリー、358 巻、1973頁(1982年))のシンメトリカル・アンハイドライド法を用いたアプライド・パイオシステムズモデルも30人ペプチド合成機で化学合成した。第1及び第2要のポリペプチドに加え、以下に示す第3要のポリペプチドも合成し、これには、huTFhと反応できる抗ポリペプチド抗体の生産に有用な、本発明のポリペプチドが含まれている。

第 3 表 抗原性ポリペプチド

12. ポリペプチドによる磊集阻害

huTF依存の凝集開始を疎開する、本発明のポリペプチドの 能力を、まず、このポリペプチドを因子リノリョ及びカルシウム イオン存在下でインキュペーションし、さらにこの混合物を、因 子リノリュ欠損血際に加えて、凝血時間を見積った。

ヒトの因子VI / VI a を例3に述べた方法で単離した。HBS/BSA m 4 当り、この単難した因子VI / VI 2 0 0 m g の溶液 1 0 p 4に、1 0 0 p 8 HBS、2 0 p 4 2 5 mM CoC 4 a 及び100

1. 因子切テプリート化ヒト血性

抗 体	因子姐	图 客率 .
ブランク	+	D
TF 8 5 C 9	+	5 B %
コントロール	+ · · ·	0

- ブランク・とは、モノクローナル抗体を検定法で用いなかったことを示している。
- b. "TF85G9"とは、ハイブリドーマTF8-569から 早難したモノクローナル抗体を検定で用いたことを示している。
- c. *コントロール*とは、検定で無関係なモノクローナル抗体 を用いたことを示している。
- 4. * + * は、抗体を混合物に加える前、因子を加え、特製した h u T P と複合体を形成させることを示す。

抗huTF抗体による凝集阻害の別の研究が、TFを因子り/VI。と会合させ、TF:因子VI/VI。複合体を形成させる前後の阻害を比較する条件下で行った。

これらの研究で、予め形成したTF: W/Wa複合体を用いた 抗 h u TF h 抗体による凝集図書を、利用するモノクローナル抗 体合有溶液 1 0 m g に M A P S 単離化モノクローナル抗体合有溶 液の代 りに、ハイブリドーマ培養上標を用いた以外、例 1 0 で述 べたのと基本的に同様に行った。比較のため、抗 h u T F 抗体に よる凝集図書を、例 1 0 で述べたように、因子 U/Waを含むク エン酸化血強との混合の前、それら抗体及び其脳質化 h u T P の 免疫複合体を形成することにより検定した。

ここで遠べている金での抗体は、この比較服容検定試験を行ったが、約60%以上の限客を示すものだけが、カロアア:W/We

a L の合成ポリペプチド会有TBSノトリトンを加えた。 種々の 海皮で含まれる多種の混合物をこのように調製し、それを、15 分間、37mに維持した。例4で述べたように縄製した耳踏質化 した組織因子を、HBS/BSAで類似し、例2で述べたような **凝集校定法でテストしたとき、10ggでおよそ45秒の凝集時** 間が得られるように翻製した。上記のように無視した混合物をさ らに、再駐営化huTF10μ & 希釈物、25 mM CaC & a 100 # L 及び I 容の血漿に対し 1. 5 容の H B S で格釈した因子 1/1/10 m 欠損血残100μg(KA州、オーバーランド・パーク、ジョー ジ・キング・パイオメティカル社)と混合した。凝血時間の延長 は、この合成ポリペプチドによる登集の選集を示していることに なる。阻害率を、例10で述べているように計算した。少なくと も30%の凝集阻害を示すポリペプチドはhuTPh結合部位ポ リペプチド類似物、すなわち;第4表のセクション1で示されて いるポリペプチド、p26-49、p146-107及びp161 - 1 8 9 である。

別に、上記頃等検定において、モノクローナル抗体による免疫 類和性吸着により、因子リグリッ欠損血器である因子リグリッ欠 損血器を用いた。ヒトの因子リグリッに対するモノクローナル抗 体を、例3で述べたように単離した因子リグリッをあってPの代 がに免疫原として用いた以外、例5で述べたものと基本的に同様 に関鍵した。できたハイブリドーマを、イライザ性で評価し、 IN州、サウスペンド、エンザイム・リサーチ・ラボラトリーズ 社から入手できるヒトの血液タンパク質、タンパク質S、因子IX、 因子X及び因子 Bと反応しないハイブリドーマを同定した。その ようなハイブリドーマ、FV 1 1、F1、2 H3 - 3.2 は、f.S. エジントン(Edainston) 博士から歌いた (CA州、ラジョラ・ スクリプス・クリニック・アンド・リサーチ・ファンデーション 社)。イムノグロブリン1gGを、ハイブリドーマFV11、F 1、2 H 3 - 3.2 を含むマウスの酸水から単層し、この単離した 1 gGを、例 8 に述べたように、固体サポートに結合させた。で きた抗因子ほグセミモノクローナル抗体含有固体サポートを貯留 した正常なクエン酸化血酸から、血腫含有液相を収穫し、保留す ること以外、例 9 で述べた免疫觀和性操作を用いて、因子は/皆a を缺くのに用いた。

融質化型で用いたとき、競合的に蓄無を阻害する、いくつかの ボリベプチドの能力を、100mをの合成ボリベプチド溶液の代 りに、100mをの解質化合成ボリベプチドを用いることにより 上記検定法での評価を行った。

脂質化合成ペプチドは、合成ポリペプチドを、単離したbatPの代りに用いること以外は、単離したhuTPの再語質化で用いた、例4で述べた方法で掲載した。ルーチンには脂質とポリペプチドの比は52:1 (マ/マ)が用いられた。少なくとも30%の凝集阻害を起こす語質化ポリペプチドが、脂質化型で存在すると含、huTP結合部位ポリペプチド類似物すなわち、第4次のセクションITで示されたポリペプチドと考えた。

第 4 表

h u T P h のポリペプチド類似物の h u T F による凝集開始の阻害

	, 144 157	
1、非リン脂質化ペプ	チド	海 皮
p 1 - 3 0	2 5. 0	10 u M
p 2 6 - 4 9	8 8 8	10 u M
p 4 1 - 7 1	2 5. 0	10 u M

た.

50 μ & のハイブリドーマ培養上清を各ウェルに入れ、1時間 37 でに維持した。さらにこのウェルをTBSで3回流浄し、過 剰の液体をアスピレータで除いた。

早離化トuTFは、例3で述べたように、免疫観和性カラムで調製した。単離化トuTFを含むアセトン性限をTBS/トリトンに溶かし、そのタンパク質濃度を、製造業者の設明書に従がい、BCAタンパク質検定は藻(ピアス)を用いて測定した。hu?Fの炭化水素側膜を、オシャネシー(0'ahanaessy) 等の報告した方法(イムノロジカル・レターズ(Jasono), Letters)。8 巻、2 ?3~2 2 ?頁(1984年))に従がい、ビオチンーとドラジド(NY州、プレインビュー、1 CNパイオメディカル社)を用いて、ビオチン化し、ビオチン化トuTF溶液を作った。

TBS/トリトン中60mg/mgに調製した50μgのビオチン化huTP将液を、5μM合成ポリペプチドとともに、各ウェルに入れ、1時間、37℃に維持した。その後、このウェルをTBS/トリトンで3回洗砂した。

5 mM EDTA、0.5 %トリトンX-100及び1%BSAを含むTBSで1/100に帯釈した、100pgのストレプトアビジンー結合アルカリホスファターゼ (NY州、ニューヨーク、エンゾバイオケム社、デテク1-alk)を各ウェルに入れ、30分間、37 にに維持した。その後、このウェルを、10mMリン酸カリウム (pB6.5)、2%BSA、0.5%トリトンX-100、0.5 M塩化ナトリウム及び1mM EDTAを含む溶液を4回洗い、ついで検出パッファ (0.1 Mトリス・塩酸 (pB8.8)、0.1 M HeCd。SmM HeCd。)で1度洗った。

その後、枝出パッファ中、2mMのpーニトロフェニルリン陸

		22 85 ± T	100430 (22)
	p 4 0 - 4 9	2 5. 0	10 u M
	p 5 6 - 7 1	2 5. 0	10 u M
	p 7 2 - 1 0 4	2 5, 0	10 u M
	p 9 4 - 1 2 3	2 0. 0	1 0 u M
	p 1 2 1 - 1 5 5	1 0. 0	1 0 m M
	p 1 4 6 - 1 6 7	8 7. 5	10 mM
	p 1 6 1 - 1 8 9	3 2. 5	10 u M
	p 1 9 0 - 2 0 9	2 0. 0	1 0 u M
	p 2 0 4 - 2 2 5	2 0. 0	10 u M
	なし	0	-
Ø .	リン脂質化ペプチド		•
	p 1 - 3 0	8 1. 0	10 u M
	p 2 6 - 4 0	B 3. 0	10 u M
	p 4 0 - 7 1	6 5. 0	10 u M
	p 5 0 - 7 1	7 3. 3	3 Ö u M
	p 9 4 - 1 2 3	9 3. 7	1 0 u M
	p 1 2 3 - 1 5 5	5 5. 0	10 u M
	p 1 4 6 - 1 6 7	8 0. 0	1 0 v M
	p 1 6 1 - 1 8 9	9 4. 0	1 0 u M
	D4 1 0 mm 45		

a. 例12で述べたように測定した阻害率

上記のポリペプチド周春研究で得られた代表的投与 - 広答曲線 を第9及び第10回に示した。

13. ポリペプテドによる抗体ートロTF免疫反応の阻害

フレキシブルピニルでできたイムロンU底 9 6 次プレート (ダイナテク社) のウェルを過剰タンパク質結合部位のプロッキングを、37 で20分間行うこと以外、例6で述べた方法でヤギ抗マウス1sG (ペーリンガーマンハイム社) によりコーティングし

を含む溶液100μ 2 を各ウェルに加え、1時間37 にに維持する。ついで、405ナノメーターでの光学密度を各ウェルについて、パイオ・テク・マイグロブレートリーダー(VT州、ウィノースキ、パイオ・テク・インスツルメント)を用いて規定した。

この競合的阻害研究の結果を第5 表に示した。 第 5 表

モノクローナル抗体とペプチドの相互作用の表

Had* pl p28 p40 p41 p56 p72 p94 p121 p146 p161 p190 -30 -49 -71 -49 -71 -104 -123 -155 -167 -189 -209

	-30	-49	-71	-49	-71	-104	123	-155	-167	-189	-209	
1F85G9		•										
TF81101	2	•										
1F85C4			•				+					
1F821F2	2				+							
1F91D5					+		+		•			
1F92C4			+	•	+		+		+			
1F92F6						+				+		
TF95C7			•)	+		+		+			
TF9684					+				+			
TF99C3			•	+	4		+		+			
TF910C2	2				•				+			
TF81F1		•										
1F91E7						+			+		•	
TP9188			4	+					•	+		
7F91B9		+										
TF94D11		+	4	•	٠							
TF9564		+			•							
TF95B7	+	+										
TF9664		•										

- a. 各モノクローナル抗体 (Mab)は、同名のハイブリドーマによ 的度生された。全てのハイブリドーマは例13で述べたように、 ハイブリドーマ培養物上資を用いてスクリーニングした。
- b. これらの抗体は、例10の結果から中和性をもたないと考えた;その他の全ての抗体は、同結果に従がい中和性をもつと考えた。

もし、ポリペプテド存在下で得られた吸光度測定値が、ポリペプテド非存在下で与えられた抗体に対して得られた平均値値から 1以上の標準保差をもつとき、図客が有意に起ったと考えた。 1 4. 2価値イライザ法による身体サンプルにおけるカロTF検 出

血液、血漿、唾液、尿、その他の身体サンブル中のカロTFは、 同じカロTF分子に同時に結合することができる2つのモノクローナル抗体を用いて検出できる。

イムロン・ポリステレンU底 9.6 大ブレートを、まず、各ウェルに、TBS中1.0 p.8 ℓ = ℓ に常駅した 1.8 G.1.0 0 p.8 年入れ、ついで、ウェルと、1.8 G 溶液との接触を、4 で、一晩維持することにより、ヤギ抗マウス 1.8 G (ベーリンガーマンハイム社)でコートした。そのウェルを、TBSで 3 回洗浄し、ついで、

がAuTFに同時に結合できる能力をもつ限り、いろいろ交えることができる。例えば、第1抗体として、TF9~6B4を用いたとき、TF9~11D12を、TF9~10H10の代りに、第2の抗体として用いることができる。このように、本発明は、本検定法で同時に結合できる種々の抗体の組合せを考案した。
15. 会プレカuTFカゴード配列を含むDNA断片の経路

全プレトロTFコード配列を含むDNA断片を第11回にその 制限地図に示されている、組換えプラスミドpCTF64、pCTF 403及びpCTF314と、この分野でよく知られている操作 を用いて構築することができる。例えば、マニアチス(Manietis) 等、NY州、コールドスプリンダハーパー、モレキュラー・クポ ラトリー、ラポラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニン ダ (1983年) 参照。

第11因で示されている組換えDNAプラスミド中に含まれる 挿入断片は、クローニングを可能にする、各末端のBcoR1リン カー5 'ーGGAATICC-3' (MA州、レキシントン、コラボラチ ブリサーチ社)を有している。これらのリンカー配列は、天然の カロTF h DNAコード配列の一部ではないので、第2回に示 されるヌクレオチド配列中には存在しない。組換えDNA分子構 接の説明は、関係する h u TF h DNA配列についても明らか なように、BcoR1末端を含む情化により生じ、これらの付加的 なリンカー配列を含む断片は、第2回で示したヌクレオチド塩器 番号によって示されるだろう。この断片は、その末端にこれら付 加的配列を含むことが理解で含よう。

プラスミドpCTF64を、制限エンドスクレアーゼEcoRI 及びDra国で消化し、第2図で示される、塩基残基1~296番 に対応するヌクレオチド配列を含むDNA駅片を作った。このよ 各ウェルに、3MBSAを含むTBS/トリトン100μ 4 そ加えた。その後、これらのウェルを1時間、37七に維持してから、TBSで3回抗浄し、さらに、過剰の液体をアスピレータで除いた。

第1のハイブリドーマ、TF9-6B6由来の抗huTF抗体 分子合有培養上待100g & を各ウェルに入れ、1時間37でに 維持した。それから、これらのウェルをTBSで3回洗浄し、つ いで調剣の液体を、Tスピレータで除いた。

例3で成製したように、免疫製和性単離し、アセトン状配化 huTFを、TBS/トリトンに溶した。このhuTF溶液の特 駅物をTBS/トリトンで5gg/sgから0.5 ng/sgの範囲 で調製し、特釈液100ggをイムロンプレートのウェルに入れ た。このhuTF箱釈液を、第1の抗体と接触させ、1時間37 でに維持した。さらにこの希釈物をウェルから除合、ウェルを TBS/トリトンで3回抗体した。過剰の液体をアスピレータで はいた。

抗ねってF抗体を、例りで述べた方法により、第2のハイブリ ドーマTFS-10K10の間水からMAPSで準難した。この 抗体溶液のタンパク質を測定し、ついで、例13で述べたように ピオチン化によりラベル化した。

このビオチン化した抗トロTF抗体をTBS/トリトンで60 ロ g / s & に第駅し、この溶液100 p & を各ウェルに入れた。 そのウェルを1時間、37℃に難持し、ついでTBS/トリトン で3回洗った。

この結合した、ビオチン化抗 h u T F 抗体を、例13で述べた デテク1-aik システムを用いて検出した。この検定法で第1及 び第2の抗体として用いているモノクローナル抗体は、その2つ

うにして作った、802ヌクレオチド塩番対 (bp) 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分面により早期し、アルカリホスファターゼを用いた処理により取りン改化した。

プラスミド p C T F 4 0 3 を制限エンドスクレアーゼ E co R 1 で消化し、第2図の残器776~1125番に対応するヌクレオチド配列を含むDNA断片を作った。生成した352bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分面により単難した。

プラスミドpCTF314を、制限エンドヌクレアーゼEcoRIで補化し、生成した647bpの断片をサイズ分画で単離した。この断片は、第2図の残器135~775番の配列に対応するヌクレオチド配列を含んでいる。647bp断片をサイズ分画で単離し、アルカリホスファターゼで脱りン酸化した。

この352 bp断片及び脱りン酸化した647 bp断片をT4DNAリポーゼの反応によって複能的に結合(ライゲーション)し、第2因の残益135~1125 音に対応するヌクレオチド配列を有する999 bpの断片を作った。

さらに、この999bp時片を、制限エンドヌクレアーゼ Dramで消化し、第2図の残器296と297者の間でこの999bp時片を切断し、これによって、168bpと831bpの断片が生ずる。さらに減リン酸化した302bpの断片と、831bpの断片を下4DNAリガーゼで機能的に結合し、第2図の1~1125者に対応するヌクレオチド配列を含む1125bp断片を作った。

PcoR J で消化して、クローニングプラスミドベクター p U C 8 を観状にした。先に調製した 1 1 3 3 bp 断片と、EcoR I 消化したベクターをT4DNAリガーゼで複胞的に結合して環状組換えDNA分子 p U C - プレカロTPトを作った。

大蒜園RRI妹(MD州、ゲイサーズパーグ、ペセスダ・リサ

特表平1-503438(24)

ーチラボラトリーズ)をpUCープレカuTPAでトランスホームし、そしてアンビシリン耐性に基づいて、トランスホーマント も選択した。それから、この選択したトランスホーマントをクローン化し、プレカuTPA構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によりスクリーニングした。

プレトロTFト構造違伝子をもつ組換えDNA分子の存在によるスクリーニングは、各選択されたトランスホーマント由来のrDN人をEcoRIで排化することによって行った。生じたEcoRI断片をアガロースゲルでサイズに従って分解した。352bp、781bp及び2682bpのDNA断片に対応する三つのパンドパターンを示す組換えDNA分子でプレトロTFト構造遺伝子の存在を確めた。上述のEcoRI構化パターンを生ずるrDNAを有する大陽面RRIトランスホーマントは、本発明の組換えDNA分子を含み、かつ、選択され(回収)された。

相胞外アンカー領域を含むが、カルポキシル末端にトランスメンプレン・アンカー領域を欠く、プレカロアドカコード配列の実質的領域を含み、従って、可容性カロアドカタンパク質をコードするDN人断片を次のように構築した。

ブラスミド p C T P 6 4 を制限エンドスクレアーゼ E co R J で 情化し、第 2 図の 1 ~ 4 8 6 番の残盗に対応するスクレオチド配列を含む D N A 断片を作った。このようにしてきた 4 8 6 b p の 断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し、その後、アルカリホスファターゼ処理で限りン酸化した。つぎに、このように限リン酸化した 4 8 6 b p の 断片を制限エンドスクレアーゼ Dra II を用いで補化し、第 2 図の 2 9 6 番と 2 9 7 番の間の部位で、4.8 6 b p 断片を切断し、2 9 6 b p 及び 1 3 0 b p の 断片とした。この 2 9 6 b p の 断片を アガロースゲルのサイズ分面で 単類した。

(1983年)) の方法に従がい、互いにオリゴスクレオチドが 複語的に結合するのを助ぐため、ポリスクレオチドキナーゼによ カリン酸化を行なわれなかったこと以外は関様にして、

- 5 ' AATTTAGAGAATAAGAATTCGGG 3 '
- 3 ATCTCTTATTCTTAAGCCC 5

の配列をもつ、合成オリゴヌクレオチドアダアター断片を作った。このオリゴヌクレオチドをアニールし、粘着 EcoR 1 末端を含む二本額 DNAリンカー断片を作り、ローザースタイン(Rotherstein)の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジー(Botheds in Enzymoi.)、6 8 巻、9 8 頁(1 9 7 9 年))に従って、平滑末端とした。つぎに、このリンカー断片を、pUCーブレbe 7 PhーTから得た7 7 5 bp断片に製能的に結合し、7 7 5 bp断片の各末端に1つのアニール断片を含む8 1 7 bp断片を作った。その後、この8 1 7 b p 断片をEcoR 1 で清化し、8 1 7 bp断片とした。この8 0 5 bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単層した。

クローニングプラスミドベクターpUCI8をBcoRlで消化 し線状化した。先に銅製した805bp断片とEcoRl消化したベクターをT4DNAリガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換えDNA分子pUCープレトuTFh-TRとした。

大陽国RRIをp UCープレトuTPトーTRでトランスホームし、p UCープレトuTPトーTRを含むクローンである、アンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

16. 組換えカップアカコード配列の免費に反カップアカの生産 組換えDNA分子由来の組換えカップアカの発現は原核性細菌 細胞、非脊椎真核性細胞及びより高等な(脊椎)真核性細胞を含 ブラスミドゥCTF314を制限エンドスクレアーゼ EcoR I で消化し、第2回の135~775番の残器に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。この641 bp 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し、ついで、アルカリホスファターゼ処理により脱リン酸化した。この脱リン酸化した641 bp 断片を、Dra Bで消化し、第2回の296番及び297番の間の部位で、この641 bp 断片を切断し、これにより、162 bp 及び479 bp の断片とした。このうち、479 bp 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画により単難した。

上述のように関題した296bp及び419bpの断片を、T.4DNAリガーゼを用いた反応により機能的に結合(ライゲーション)し、第2図の1番から775者の配列に対応するスクレオチドアグプター配列を有する775bp断片を作った。

クローニングプラスミドベクターpUCl8をEcoR1による 彷化で級状化する。上記のように調製した 7 7 5 bp 断片と、 EcoR1消化ベクターをT4DNAリガーゼで機能的に結合し、 環状組換えDNA分子pUC-ブレカロTFA-Tを作った。

大縄国RRIを、pUC-プレトuTFトーTでトランスホームし、pUC-プレトuTFトーTを含むクローンであるアンピンリン耐性トランスホーマントを選択した。

組換えDNA分子pUC-ブレトuTFh-TをEcoR1で消化し、生成した115bp 断片をサイズ分画で単離した。

カルーザース(Carothers) 等(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.)、103 他、3185頁(1981年))及びゲイト(Gait)等(コールド・スプリング・ハーパー・シンポジウム・クオント・パイオロジー(Cold. Spring Rarbor Symp, Quant. Biol.)47他、393

む種々の発現媒体中で行うことができる。そのような発現媒体の 代表例には、各々、大陽国S。セレビシアエ(cerevisise)及び チャイニーズハムスター部巣 (CHO) 細胞がある。

a. 大路裏におけるプレトuTFトの発現

大陽関において、プレトロサドト構造遺伝子を発現できる組換えDNA分子は、例15で作ったpUC-プレトロサドル組換えDNA分子由来のプレトロサドル遺伝子合有DNA断片を単離し、ついで、この断片を原核性発現ベクターに複能的に結合することにより構築することができる。

退換えDNA分子pUC-プレトuTPhを、そのプラスミド中に存在するEcoR1部位を部分的に切断するような条件で、EcoR1消化する。この部分消化法は、アニアチス(Baniatia)等、NY州、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリング・ハーパー・ラボラトリーズ、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニングにより詳細に報告されている。図2の残器1番から、1125番で示される配列に対応するヌクレオチド配列を含む1133bp断片を、サイズ分画によりEcoR1部分分解度物から単離した。

原核性発現ペクターア K K 2 2 3 - 3 (N J 州、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) を、 EcoR I による消化で級状化した。この消化ペクター及び I 1 3 3 bp プレト u T F h 構造遺伝子合有断片をT 4 D N A リガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換え D N A 分子 p K K - プレト u T F h を作った。

大場関RR1キッドドープレカロTFAでトランスホームし、 pKKープレカロTFA合有クローンとしてアンピシリン財性トランスホーマントを選択した。

b. 大腿面におけるhuTFhの発現・

大場面においてカロ下下遺伝子を発現することができる組換え DNA分子は、例16aで掲載した1133bp断片を操作して構 扱した。食ずこの断片をアルカリホスファターゼで脱リン酸化し、 ついて、制限エンドヌクレアーゼBbvlで補化した。生じた964 bpの断片は、第2図の残器164~1125智に対応するヌクレ オチド配列を含んでおり、サイズ分面により早難した。 先に述べたように、

及び

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作り、ロザーステイン(Rotherstein)等(メソッズ・イン・エンザイモロジー(Hethods in Enzymol.) 68巻、98頁(1979年))の方法に使って、結署とcoRI及びBbvl来略を含む二本鎮 DKAリンカー断片をアニーリングすることにより作った。このリンカーをまず964bp 断片に規範的に結合して、1008bp 断とした。ついて、1008bp 断片を、T4DNAリガーゼを用い、EcoRI消化したベクター pKK223-3と独能的に結合し、環状超換えDNA分子 pKK-AuTFhを作った。

組換えDNA分子。KK-AuTPAは、。KK-Tレ hotfb と、山残路1~129番の残酷がない、及び四新しいメチオニンコドンが、残酷130番の前に機能的に結合しており、その結果 タンパク質発現(翻収)が挿入されたメチオニンコドンの場所で 始まることだけが異なる。

組換えDNA分子 pKKープレカロTFA及びpKKー bufFA を、その中に含まれる構造遺伝子によりコードされるAuTFA

た。それからこの選択したトランスホーマントをクローン化し、 モノクローナル抗体TF8-5G9を用いて、発現するプレ カロTFhタンパク質の存在を各クローンについて決定して、 pSV-プレカロTFhの存在に関する選択を行った。

d. CHO細胞におけるカロTFカの発現

本乳類相節において、huTFhを発現することができる組換えDNA分子を、例16c由来のpSVープレhuTFhを、制限エンドヌクレアーゼBellで情化することにより構築した。生成した1153 bp 断片をサイズ分画で早難し、つづいて、制理エンドヌクレアーゼBbvlで消化した。生じた976bp 断片は、図2の残器166~1125番の配列に対応するヌクレオチドアダプター配列を含み、これを、サイズ分画により早難した。

先に述べた方法で、

及び

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を合成し、アニールして、粘着性 Boll D 及び Bbvl 末端を含む二本鎖 D N A リンカー新片を作った。ついで、このリンカーをT4DNAリガーゼを用いて974bp 断片に複能的に結合して、第2図の残器130~1125番の残器の配列に対応するヌクレオチド配列を含む、1018bp 断片を作った。

ブラスミド発現ベクター pKSV-10を、BalBで消化して 級状とし、ついで、T4DNAリガーゼを用いて、1018 bp 断片に機能的に結合し、環状組換えDNA分子 pSV-buTPb を作った。

組換えDNA分子 pSV-プレカロTFh及び pSV-hotFh

又はプレトuTFトの発現に適合する原族性育主媒体に導入した。 そのような宿主媒体の代表例は、大陽菌RRJ株である。この信 主を、超換えDNA分子でトランスホームし、細胞増殖とこの超 換えDNAの発現に適合する条件下で培養し、この発現したタン パク質を従来の技術を用いて収穫した。

c. CHO細胞におけるプレカuTFhの発現

脊椎動物和酸中、プレトッTPA違伝子を発現で含る組換え DNA分子を例16 a で調製した1133 b p 断片を用いて構築 した。

カルーザース (Carvibera)等及びゲイト (Gait) 等の方法 (上記) を用い、

5'-AATTCCCGGG-3'

5 ' - GATCCCCGGG-3'

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作った。 ついでこのオリゴヌクレオチドアダプター断片を、ロザースタイン (Rotherstein)等の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジー (Nethods in Enzymol.)68巻、98頁(1973年))を用い、1133bp断片の各来端に結合し、元々1133bp断片に存在するEcoR1粘着来適を、Bs11粘着来適に転換した。

真体性シミアンウイルス (SV40) を基本とする発現ペクター、 pKSV-10 (NJ、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) を、制限エンドヌクレアーゼBellによる補化で課状化した。 1133bp のBell 通合断片及び、Bell I 摘化ベクターを、T4DNAリガーゼを用いて、機能的に結合し、環状組換えDNA分子pSV-プレカuTF)を作った。

大腸菌RRIを、 pSV - プレカuTFカでトランスホームし、 アンピシリン耐性のトランスホーマントを選択し、クローン化レ

を、内在する構造遺伝子によりコードされるAuTFA又はプレ AuTFAタンパク質の発現するのに適合した真核性宿主媒体中 に導入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、CBO 細胞がある。

店主を、組換えDNA分子でトランスフェクトし、安定なトランスホーマントを従来法で退択した。例えば、グラハム(Graham)等、ピロロジー (Virol.)、52巻、456頁 (1973年)及びサウザーン (Soothern) 等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス (J. Mol. Appl. Genet.) 1 巻、327~341頁 (1982年) 参照。トランスホームした宿主初版を、相随増殖及びその組織えDNA発現に適合した条件下で培養し、発現したタンパク質を、従来法により収穫した。

*. イーストにおけるプレカロTFhの発現

S. セレビシアエ (cerevisiae) において、プレカロTFA 遺伝子を発現できる組換えDNA分子を、先に述べたように、

5 ' - A A T T C C C G G G - 3 '

5 ' - CGCCCGGG - 3 ' .

の民列をもつオリゴヌクレオチド、アダプター断片を合成し、ついて別16 a の1133b p 断片の末端に、それを結合することにより構築した。このようにして作ったアダプター化した断片は、Cla1 粘着末端をもつ。

イーストの発現ベクター、 pTDT1 (アメリカン・タイプ・ティシュコレクション、 #ATCC31255) を、制限エンドヌクレアーゼClaIでの情化により線状化した。上記のClaIアグプター化1133bp 断片及びClaI情化ベクターを、T4DNAリガーゼを用いて、機能的に結合し、環状の組換えDNA

分子pYープレhuTPhを作った。

大時間RRIモプレカロTFカでトランスホームし、プレカロTFカ構造遺伝子を発現するトランスホーマントを、例16 cで述べた方法により同定及び選択を行った。

1. イーストにおけるhuTFhの発現

S. セレビシアエ(cerevisiae)において、huTFh構造 遺伝子を発現できる組換えDNA分子を、pY-ブレhuTPhのClaiによる情化により、第2回の残器1~1125番の配列 に対応するヌクレオチド配列を含む1151bp断片を作ることで構築した。サイズ分画による単類は、1151bp断片をBbvIで情化し、第2回の残器164~1125番の配列に対応する ヌクレオチド配列を含む973bp断片を作った。この978bp断片は、サイズ分画により単難した。

及び

の配列をもつ合成ポリスクレオチドアダプター断片を作り、先に述べたように、アニールすることで、Clal及びBbvl 粘着末端をもつDNAアダプターを作った。まず、このアダプター断片を、978bp 断片に機能的に結合することにより、1020bp 断片とした。つづいて、この1020bp 断片を、T4DNAリガーゼを用い、例160で述べられているように調製したClal情化pTDT1ベクターと結合し、環状組換えDNA分子pYー huTFhを作った。

超換えDNA分子 pYープレカロTFA及び pYーカロTFA を、内在する構造遺伝子によりコードされるカロTFA又はプレ カロTFAクンパク質の発現に適合するイースト宿主媒体中に導

17. ポリペプチド p24-35及び p159-169による凝集 関奪

第7度にそのアミノ放残器配列を示した例11で述べたように 合成した。

第 7 衰

ペプチド名 アミノ紋芸器配列 924-35 B-EHEPKPVNUVYI-08 p159-169 E-!YYLYVVISSSSSKKTAK-0H

a、各ポリペプチド実験名は、第1回に含まれているアミノ散発 各配列を差わしている。

それから、ポリペプチド p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 9 - 1 6 9 に ついて、例 1 2 で述べられているように、 h u T F による る 類 所 始を 競合的に 阻害する 設力を 検定した。 この 研究の 結果を 第 1 2 図に 示し、 p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 9 - 1 6 9 は、 1 0 μ M 複度 で用いたとき、 各 * 、 h u T F で 開始した 桑葉を、 4 5 % 及び 2 5 % 図 書できることを 示している。 この研究において、 第 1 2 図 で 白丸により 示したこれらペプチドに 対する 阻害 パックグランド は、 第 4 表で 示した 実験 結果 よりも 低いことに 注意 しなければ ならない。 結果として、 この 研究において、 1 0 μ M 機 度での 類 図 書を 少なくとも 2 0 % 起こす ポリペプチドは、 h u T F 結合 部位 ポリペプチド類 仮物と考えた。

従って、ポリペプチド p2 4 - 3 5 及び p1 5 5 - 1 6 9 は本発明の h u T F h ポリペプチ F 結合部位類 収物を示している。また、ポリペプチ ド p2 5 - 4 9 で 得られた同様の結果を考慮すると、 p2 4 - 3 5 で得られた結果は、 h u T F h - 因子 W / W a 結合部位は、これら 2 つのポリペプチ F の共通部分、 すなわち、

入した。このような媒体を含む存主細胞の代表例には、S。セレ ビシアエ (cerevisiae) 細胞がある。

唐主祠物を、この組換えDNA分子でトランスホームし、選択 培地で培養して、従来住により、トランスホームした認防を単離 した。例えば、ハイネン(Binnen) 等プロシーディング・ナシ ッナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Hatl. Acad. Sci.)USA、75巻、1923頁(1978年)及び、ミヤジ マ (Miyajima) 等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオ ロジー (Hol. Cell. Bjol.) 4 巻、407頁(1984年)参 限。トランスホームした細胞を、細胞増殖及び組換えDNA発現 に通合する条件下で培養し、ついでこの発現したタンパク質を徙 来法で収穫した。

8. 組換えねってFhコード配列の発現による可溶性huTPh の生産

超換入DNA分子からの可溶性huTFhの発現は、プレhuTFh及びhuTFhに対し、例15で述べたのと関核に、後々の発現媒体で行なわれた。その例において、EcoR1粘着生体を有する断片を含む1133bpのプレhuTFh排洩遺伝子の例16b-1での操作で、大路の、S. セレビシアエ (cerevisiae)及びCHO知識の3様の発現媒体において、プレhuTFh又はhuTFhを発現できるベクターを作った。関域に、EcoR1粘着実施を有する可容性プレhuTFh構造遺伝子を含み、例16aで調製した805時の断片を例16b-1で述べた方法に健がって操作し、これる同発現媒体中可容性プレhuTFhを発現できる発現であるのではない。アトルを発現できる発現ベクター(すなわち、プレhuTFh-TR又はhuTFh-TR)を作った。

第1回で示した残蓄30~35、(-VNGVYT-)のナミノ 放残器配列で作られていることを示していることに注目すべきで ある。

18. 抗huTF抗体による凝集阻害の速度論

抗ね u T F 抗体が、 ね u T F の 数 集 閉 站 を 阻 害 で き る 時 間 を 測 定 す る た め 、 こ の 阻 害 の 時 間 経 過 を 、 例 1 0 で 述 べ た 阻 害 検 定 権 を 用 い て 測定 し た 。

例7で述べたように調製した、MAPS単離化TP8~5G9モノクローナル抗体およそ1 ng を、100μ4HBS/TBS中、例4で述べたように類製した再脂質化 hn TPおよそ1 ngと混合した。このように形成した種々の混合物を、37でで、約1から60分の間の種々の時間維持し、抗 hn TP抗体を、huTFと免疫学的に結合させ、免疫反応座物を作った。第13回で示した時間に、各混合物について、例2で述べたように、huTFの森血活性を検定し、ついで、例10で述べたように限害率を示した。

新13図で、このような速度論的測定の結果は、この検定で用いた抗体及び精製した Au TFの構成で、65 M以上の Au TF による凝集開始の阻害が、10 分以内に起こることを示すことが分本。より高い抗 Au TF 抗体機度では、より速く、完全な阻害が起こると考えられる。

19. 抗トロTF抗体による、トロTPによる凝集研始図客の投与 一応等

抗体投与範囲にわたる、AuTF模集開始を阻害する本発明の抗AuTF抗体の能力は、次の修正をした例で述べた方法により 検定した。例4で調製した再踏質化AuTFlnsを、C.lns のHBS/BSA中、例7で述べたように単難した、根々の者の

特表平1-503438(27)

TP8-5G9モノクローナル抗体と混合した。このように興製した混合物を維持して免疫反応変物を作り、つづいて例10で流べたように、buTFの森血活性に関する検定を行った。

そのような技与一応答検定の結果を、第14回に示し、 c た、 このことはこの研究で用いた h u T F 遺皮に対し、 m 4 当り、 お よも 1 ~ 5 n g の抗 h u T F での最高値の半分の阻害を示してい る。

同様の投与一応答実験を、 h u T F 源として溶解したヒト細胞を用いて行なった。

ヒトの繊維芽的飲系列GM1381 (NIGMSヒューマン・ジェネチック・ミュータント・セル・レポジトリー)を、2mMクルタミン、5%ウシ胎児活性及び抗生物質を持った、ダルベコ体正イーグル特地 (DMEM、NY州、グランドアイランド、ギブコラボラトリー)中、37℃で、7%(ッ/ッ)二酸化炭素空気芽囲気下で培養した。GM1381初胎を増殖し、そして収穫し、さらに30×10。個の結散のベレットを達心で関製し、一70℃で凍枯した。この凍枯ベレットをHNパッファ(25mMペペス、140mM NaC2、pH7.0)中の15mMペータ、オクテルグルコピラノシド溶液 9 msを溶解した後、HN18msをに10分間37℃に維持して、細胞を溶解した後、HN18msを加えて、細胞溶解物を作った。

例17で述べたように単層したモノクローナル抗体TF8-5G9を、第15図に示した機*の投与に対し、001%BSA(シグマ、RIA級)で帯釈した。それから各抗体帯釈物25μ2に、先に課題した相胞溶解物225μ2を加え、50分間37にほって、抗体を細胞溶解物中に存在するhuTFと免疫反応定性、免疫反応定物を形成させた。その後、25mM CaC4。

ーシェン混合物100μ8を、50μ8のヒト因子U欠損血禁及び50μ8の50mM CaC4 に添加することにより測定した。37で、1分徴、相同機の血液の10倍粉末物50μ8を因子U源として加え、最血形成時間を2度測定した。

24個のMoAb のうちの18個がパブーン諸TF又は、アフリカ・ミドリザル脊球細胞抽出物のプロコアグラント活性を阻害した(第8表)。しかし、MoAb のいずれも、ラット、ウサギ、子ウン、イヌ、羊又はブタのTFと、交差反応を示さなかった。すなわち、相同的因子知源の存在下、ヒト因子切欠失血鉄のリカルシフィケーション時間促進能を示すTFF契物ではなかった。 依体のいずれも、正常なヒト血無での検定による、ウサギTFのコアグラント活性を示さなかった。 50 µ 8 を、免疫反応度物を含む溶液 50 µ 8 と混合し、ついで、 50 µ 8 のクエン酸化ヒト血漿と混合し、凝集を開始させた。このようにして作った混合物を 37 ℃に維持し、血量の熱加と、凝血形成の間の時間を測定した。効果的 h u T F 遠度及び阻害事を例10 に述べたように計算した。

トu TF 孤として、ヒトG M 1 3 8 1 相 版 辞解 物を用いた 独与 - 応答 図 客 検定 からの 結果 を、第 1 5 図 に示した。 これらの 結果 は、 TF 8 - 5 G 9 抗 h u TF 抗 体 が、 m 4 当 り、 お よ そ 8 -1 0 n g の 抗体 過度 で h u TF の この 細胞 溶解 源の 半分の 図 寄 を 起こしたことを示している。

20. 非ヒト組織因子とMoAbの交差反応性

超複因子を、超超機(ラット、ラピット、子ウシ、イヌ、単、ブタ及びヒヒ)又は、超機均衡細胞(アフリカミドリザル腎臓(COS)細胞)から単離した。組織又は細胞を砂解し、膜をはぎ、ミンチし、組機1g当り、1g ののアセトン中では過した。モートし、ついで、彼圧下、ワットマンは1ペーパーでは過した。この固体をアセトンに延縮し、もう5回該過し、一晩空気乾燥したのち、-30℃で保存した。開始湿度量の16~19光を含む IBS中、5%(*/*)となるよう整濁し、金温で1時間混合した。10.000×*8、20℃、30分間の湿心で固体を無め、ついて下含有限を10.000×*8、1時間の上滑の違心で気めた。このペレットを、TBSに懸濁し、-80℃に保存した。

助物TP(TP活性をもつ複組被抽出物)による抗体阻害を、 次のように測定した。等容量のTP(1 ml/ml)及びハイブリ ドーマ上清(TBS/BSAでの10倍新駅物)を、37でで2 時間インキュペートした。残存するTP活性を、そのインキュペ

第 8 英

		R1A2	ドット	7279	ンブロット	阻害	卒工	動物
noab	747945	(cpm)	ブロット	R	KR	養血"	18.	の阻害
			-				~	
TF8-5C4	JaGI. #	6242	+	±	+	95	57	
TFB-5G9	laGl. #	28587	+	-	+	99	80	••
TFB-11012	1261. *	29453	+	•	+	99	82	
TF9-1F1	IgG1. #	25133	+	•	+	95	83	н.3
TF9-105	IgGl. ≈	3872	+	+	•	95	76	3 .3
TF9-1B7	12G1. #	28586	+	+	+	97	90	n.3
TF9-188	Ig61, #	28552	+	+	+	98	83	n.3
TF9-1B9	IgG1. #	28523	+	+	+	97	84	H.3
TF9-2C4	146], #	24435	+	•	+	97	78	n.3
TF9-2F5	1g\$1, #	27422	٠.	+		97	79	n.3
TF9-4D11	IgG1. #	25994	+	+	+	97	81	n.3
TF9-5G4	1 gG1, #	24073	+		+	97	83	M.3
179-5B7	1 g 6 1 . #	25819	ij	+	+	97	74	M. 3
7F9-5C7	IgG1, #	24543	•	+	+	. 96	72	n.3
TF9-6B4	1:61, s	17894	4			96	98*	n.3
TF9-6G4	1461. #	24065			•	95	78	H. 3
TF9-6C9	1 gG1. #	8054	+		+	95	47	
TF9-7E10	IgG1. #	8025	•	+	+	97	54	
TF9-8E3	BgG1. €	29152	+	+	4	97	76	н. з
TF9-9E1	1gG1. #	18169	+	+	+	90	71	n.3
F9-9C3	1 : G1, A	30222	+	+	. +	97	82	n.3
TF9-984	1 gG1. #	33728	+	+	+	95	82	и.3
TF9-10C2	IgG1. #	28692	+	•	•	98	71	н.3
TF9-10810	IgG1. #	24585	+	•	+	O	20*	••
PA 100	IgG, «	1929		-		0	0 -	••

第 9 表

モノクローナル抗体TF8-5G9による、

種⇒の細胞及び組織の凝血活性の囮害

TP话性课	抗体なし	F F 活	性(% 100		8-569
特製ヒト語でF	1569	1520	(3%)		(B4%)
相联抽出物	2059	2059	(01)	411	(80%)
相贴毁抽出物	1287	1344	(0Z)	159	(883)
GM)381機雜芽細胞(溶解化)	990	966	(2%)	143	(86X)
ヒト単球 (溶解化)	2893	2745	(5%)	176	(94%)
J82 膀胱がん細胞 (溶解化)	882	902	(0X)	93	(892)
ウサギのトロンポプラスチン	2106	2108	(0X)	2157	(01)

- 精製したヒト扇丁ドを、テスト前にリピロトピヒクルに再構成した。
- 2. 右の2つの間は、指示されている特製 I g G で処理した後間 定した、ミリユニットで表わした残留 T P 活性の2回の平均値 が示されている。残存する T P 活性の制定的、サンプルを3? でで20分間、10 p g / m g の I g G と インキュベートした。 カッコ内の値は、銃体なしの周サンプル活性ユニットに対する 阻害率が示されている。

21. 因子は結合の研究

因子ザノゼミのTFへの結合は、機能性TF:ザノゼミ森集促 遺複合体の集合に必要とされるので、因子はノザミのTFに対す ろ結合を妨げることによる、第8表に示したMoAbのTF哲性 中和能がテストされた。

ヒトの組織因子仲介による、因子はのJ 8 2 の膀胱がん相触表面への結合はよく調べられている。フェア (Fair) 等、ジャー

1、 特にことわらないかぎり、全ての結果は、ハイブリヤーマ組織特殊上滑の10倍等数数を用いて得られたものである。毎分当りのカウント数(cps)で表わされているラジオイムノアッセイの結果は、ラクトパーオキシダーゼを使ってラベルした1381-TFを用いている。

- 2. 遠元 (R) 又は非遺元 (NR) のサドを用いて行ったウェス タンプロット。
- 3. 特製したヒトの脳TFによって誘導されるヒト血法の凝結の 図書。
- 4. J82細胞に対する特異的 ***] 因子VI/VI a 結合の阻害。
- 5. 粗ヒヒ臼抽出物 (B) 义は溶解COS細胞 (M) により誘導されるヒト血素凝集阻害。 M。 Ab が60%以上の凝血器性を阻害するとき、文字がその後の場所に入れられている。

種々のヒト智髄及び組織により発現される森血活性の阻害をMoAb TF8-5G9を用いて詳細に試験した。TF8-5G9は、J8G漢度≥1月8/m2のときの90%以上、精製再踏質化したヒトTFの機能を中和する(第16図)。ヒトの細胞溶解物及び組組機抽出物の森血活性を阻害する、このMoAbの能力も示されている(第9表)。10月8/m2の18G漢度でのTP8-5G9は、組経及び胎盤のTセトン粉末及び溶解したヒトの機種芽詞胞、膀胱がん細胞及び内毒素活性化末槽血液単核細胞の凝血活性の80%以上を定量的に阻害する。

ナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chea.)、262巻、11692(1987年)。従って、報助表面 hv7F: ゼノゼ a 複合体会合に関するM。Ab の効果は、J82 細胞を、 坑体とプレインキュペートし、さらに、 ***1 - 因子ザノゼ a の 特異的結合を定量することにより試験した。

J82細胞を12大培養プレート中、フェア (Fair) 等によ って報告されているように(上述)、魚密化するまで培養し、パ >7 A (137mM NaC&, 4mM KC&, 11m ao), Lーグルコース、5mMアジ化ナトリウム、10mMへペス、 pガ 7. 4 5) で洗浄し、ついで、精製したMoAb I a G 又は、 ハイブリドーマ培養上清10倍岩釈物を含むバッファA0.7 = # とともに、37℃で2時間インキュベートした。塩化カルシウム 及び、 1881 - 因子物/彼 8 を各々、最終浸度 5 mM及び 1 mM となるよう添加し、さらに37℃、2時間インキュペートした。 その後、細胞単層を、冷パッファB (1 4 0 m N m C & 、 0.5 **MBSA、5mMトリスHCg、pH745)で5回洗浄し、1** adの0.2M NaOH、1%SDS、10mM EDTA溶核中 で溶解し、その溶解物のガンマ線をカウントした。特異的結合は (非ラベル因子VI/VIaを100倍過剰存在下、細胞と会合する した。特異的結合の風客率は9容のパッファAと、1容の符集培 地で処理したコントロール細胞に対する、M o Ab で処理したJ 8 2 細胞という形で測定した。

因子リンピュがTPに結合したとき、それはうまく取り込まれないが、抗体結合によるTPインターナリゼーションの可能性を はくため、J82細胞を、5mMTジ化ナトリウムで代謝的に毒 致した。細胞のアジド処理の有無にかかわらず同じ結果が得られ た。

この研究の結果は、上の第8表に示されている。TF活性を関 寄する全ての28個のMoAbは、因子サノVa 結合も阻害した。 予想されるように、TF活性を阻害しないMoAb、TF9-10H10は、因子Vの結合を阻害しなかった。

22. J 8 2 細胞による因子 X a 形成の阻害

J 8 Z 組設上でのhuTF:W/Y a 複合体による因子X a 形 成速度を、次の修正をした、フェア(Fair) 等(ジャーナル・ オブ・パイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 、 2 6 2 巻、 1 1 6 9 2 頁(1 9 8 7 年))により報告された、多 穴培養プレート検定法を用い 2度定量した。細胞を、12穴プレ ート中で培養し、J82和胶への因子VI/VIa結合の際に上述し たように、検定開始前、種々の護度の精製した、MoAb のIs G 百分と37℃で2時間プレインキュペートした。単一の温度の因 子リノリョ (1mM) を検定で採用した。因子Xを最終濃度50 με/ = εとなるよう添加した後、5、10、15分の間隔で、 5 0 μ 2 の上浦を採取し、5 5 0 μ 2 の 5 0 m M トリス・HC 2、 2 2 5 mM NaCl、50mM EDTA (pH 8.2) の溶液中 に入れた。発色性因子Xa莶質添加後(TX州、ピューモント、 ヘレナラブ社、 3.4 m M S-2222 50 μ &) 、速度論的分 折モジュールをつけたペックマンDU-30分光器で105ヵm の吸光度の増加を視定することにより、因子Xの活性を定量した。 因子リンリョ非存在下でインキュベートしたJ82級敗上滑のS - 2 2 2 2 加水分解によるパックグランドを各港定値から差引い た。抗体処理の固害率は抗体とのプレインキュペーションなしの 細胞に対して計算した。

M o Ab T F 9 - 2 C 4 及びT F 9 - 5 B 7 による J 8 2 細胞

の処理に対する国客曲線は、因子×ョ形成速度が、因子り結合を 国客したものと同様の抗体環度で阻害されることを示している (第17回)。非阻害的(非中和性)MoAb TF9-10H10 はIsG環度10ps/sksで、凝血促進活性、因子は/%s 結合又は因子×ョ生成速度にほとんど影響を与えないし、また、 コントロールMoAb PAb 100は全く効果がない(データ示さず)。

23. huTFhポリペプチドの因子VI/VIIへの競合的結合による。 J 8 2 細胞上での因子X 活性化の顕著

当分野ではよく知られているように、凝血促進プロテアーゼカ スケードの胡助活性化は、消費性血栓出血症と呼ばれる種々の病 気と関連している。一般に、凝血促進プロテアーゼカスケードは、 膜レセプター及び基本的共因子、組織因子(TF)に対する因子 VI/VI:の高い栽和性による発見により、細胞表面で開始する。 TF及び因子なノVI = の二分子凝血促進復合体(TF: VI/VI ») は、最終的にトロンピン形成及びフィブリンの析出につながる限 定したタンパク質分解による因子X及びXの活性化を起こす。さ らに、最前におけるTPの役割、TPによる器無プロテアーゼカ スケードの開始は、措種性血管内鞣固及びトロンポジェネシスと 関連する。ニーメツ (Kienstz)等、ブラッド (Blood) 4 2 巻、 4 7 頁 (1973年) 及びベビラクア (Bevilacqua) 等、ジャ ーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Hed.) 、 160巻、618頁 (1984年)。 TFは、炎症性仲介物に対 する応答及び細胞性免疫応答で、単球及び内皮細胞の表面で発現 する重要なエフェクター分子である。

本発明のhuTFhボリベブチドが、因子リノWョに結合し、 それにより、因子Xを活性化することができる、TF:リノWョ

第10表 . holfポリペプチドを用いたJ82 細胞に関するX活性化の阻害

•	•
h u T F ポリベブチド	光学密度,
PBS	0. 9 6 0 ± 0. 0 8 3
因チャンリンなし	0.005±0.001
p 1 = 1 8	1. 0 0 7 ± 0. 0 B 7
p 1 - 3 0	1. 0 9 8 ± 0. 0 2 8
p 1 1 - 2 8	0.687±0.071
p 2 4 - 3 5	0. 4 7 7 ± 0. 0 1 7
p 2 6 - 4 9	0. 4 3 7 ± 0. 0 2 0
p 4 0 - 7 1	0.814 ± 0.053
p 7 2 - 1 0 4	0. 7 8 1 ± 0. 0 4 7
p 9 4 - 1 2 3	0.818 ± 0.055
p 1 2 1 - 1 5 5	0. 8 8 9 ± 0. 0 6 7
p 1 4 4 - 1 5 9	0.507±0.053
p 1 4 6 - 1 6 7	0.004 ± 0.001
p 1 5 7 - 1 6 9	0. 3 8 9 ± 0. 0 3 5
p 1 6 1 - 1 9 0	0. 8 0 0 = 0. 0 2 3
p 1 9 0 - 2 0 9	0. 6 2 5 ± 0. 0 3 1
p 2 0 4 - 2 2 6	0. 7 1 5 ± 0. 0 4 2
p 2 4 4 - 2 6 3	0.619±0.047

もし、先学濃度(O.D.) が約0.500以下なら、因子Xの活性化の阻害は有意であると考えた。

本研究の結果は、huTFh ポリペプチドp 2 4 - 3 5、p 26 - 4 9、p 1 4 4 - 1 5 9、p 1 4 6 - 1 6 7 及びp 1 5 7 - 1 6 9 は、因子VI / VI a に結合し、因子X を活性化できる、TF

: Ⅵ/Ⅵ : 複合体の形成を図客することを示している。これらの

複合体の形成を阻害する能力を研究した。

TBS中、100μMのカッTFポリペプチド類似物を含む熔液50マイクロリットル(με)を、86次平底ポリスチレン検定プレートの各ウェル96個に入れ、ついてその各ウェルに、別3で述べたように単離した、TBS中1nMの速度に調整した因子以1/以2を含む溶液25μ&を加え、さらに、TBS中20mlの塩化カルシウム25μ&を加え、その混合物を80分間宜温に維持した。

ヒト膀胱がん細胞 J 8 2 細胞を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC HTB1; MD州、ロックヒル)から入手し、参考としてここに超込まれているフェア (Fair)等の方法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー)、2 6 2 巻、1 1 6 9 2 − 1 1 6 9 8 頁 (1 9 8 7 年)) に従って済奉した。

 50μ 8のTBSに 5×10^4 個のJ8 2 細胞を延編し、上述の維持を行った後、ポリスチレン検定プレートの各ウェルに入れた。その後、ただちに、フェア (Fair) 等の報告のように (上述) 単離した、TBS中 100μ 00回度の因子 25μ 8及び、3 発色基質S-2222 (1π 7 π 8 TBS) 50μ 8 を加え 混合し、その混合物を2分間 宝温に維持して、発色反応座物を含む将接とした。

生成した発色度物量を、V‐max 9 5 大スペクトロホトメータ (カリホルニア、マウンチン・ピュー、モレキュラー・デバイス 社)を用い、405ナノメーター(nm)での光学密度(0.D.) を測定して定量した。ポリペプチドの代りにTBSを用いるか、 又は、因子VI無添加のコントロールも測定し最高及び最低OD値 を決定した。これも国客の例定結果を第10表に示す。

結果は、本発明のカロTF結合部位ポリペプチF鎖収割が凝集を 阻害するのに用いることができることを示している。

24. 抗 h u T F b M o A b による凝集の生体内での阻害

しばしば、グラム降性相関による腐敗症は、最終的に死に至ら しめるショック状態を起こす。このヘモスタチスシステムの乱れ は、このショック状態の展開と密接に関係している。テイラー (Taylor)等(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション (J. Clin. Invest.) 79巻、918~825頁 (1987年))は、外的に加えられた活性化した、タンパク質 C、天然の抗毒血酵素、は、凝集応答及びヒヒにおけるL D.e.s の大語菌藻度の致命的効果を妨害する。

本発明の抗凝無M。Abの生体内における過無図審権力を、テイラー(Taylor)等(上述)によって報じられた腐敗ショックのヒヒモデルを用いて試験してみた。 遠さを計った 7~8のヒヒを実験前一晩絶会し、実験の朝、ケタミン(始内注射、14年/24)で免疫化した。ついで、ベントバルビタール酸ナトリウムをを、経皮カテーテルを通し、関の静脈に投与し、軽いレベルの外科的麻酔状態に維持した(約45分毎2年/24)。大腿部静脈を無固的に詳出させ、血液採取の為1方の後足にカニュールを差込んだ。経皮カテーテルは大陽菌及び例20で示した、M。AbTF9~5B7を含む試剤を与え、ヒヒのTFと交差反応させるのに用いた。30分間の平衡化時間の後、この動物に約10分間にわたって、MoAbTF9~5B7、500μ8/14又は15μ8/14(例7で述べたように単離し、ついて無菌生理食塩水に透析し、0.58μ8/ms/takeのMoAb

M o Ab 投与及び30分間の平衡化の後、各動物は、L D: **

の大鶏歯の投与を受けた(約10°個、投与後約8~16時間で 敗血性ショックのため死をもたらす量である)。大鶏属は2時間 に減り注入により投与した。この研究結果を第11表に示す。

第11表 ヒヒの敗血性ショックによる致死の生体内における関止

グループ	Boab	投与	森 血'	춫 썌 춫	死
I . 7>10-3	TP9-587	500	Normal	No	No
1. 3>10-1	BB*	500	Horma)	Yes	Yes
I, A R	119-517	500	Normal	Yes	No .
	TF9-587	.150	Normal	Yes	No

- 1. 血圧、凝集活性化及びフィブリン分解変物を含む種々のヘモスタチスパラメータは、MoAb投与後、大陽面往入前に測定した。
- HBは、TF9-5B?と同じ競及び亜鎖のMoAbであるが、無関係の拡配と免疫反応を起こす。

第11表にみられるとおり、MoAb TF9-5B7を受けた ヒヒはLD... の大陽菌の投与に対しても生存しつづけた。HoAb 150με/W及び500με/Wの両投与で保護された。さら に、コアグロパシーと関係する、顕著な低血圧、凝集カスケード 活性化およびフィブリンの分解は、MoAb TF9-5B7を受けた動物で著しく緩和された。

25. ヘモグロビン・アルファ鎮としての、5 BiDa h u T P へ テロダイマー経鎖の特徴

免疫気和性単離したTPをさらにウェスタン・ブロット分析で 特性を調べ、58kD huTPへテロダイマーの成分、すなわち、 例4で述べた47kD。及び125kD。タンパク質を同定した。

なるという結論を支持している。

使って、現在、例もで述べられている5 8 kDa ヘテロダイマーの12 5 kDa 軽額成分は、ヘモグロビンのアルファ額であり、4 7 kDa h u T F 卓型操作のアーテファクトであると考えられている。

別1~25の結果のまとめと対論

2つの異なる細粒融合体由来の、ヒト脳TPに対する、24種のMoAb ライブラリーについて報じられている。各MoAb の免疫特異性は、ドットプロット、ウェスタンプロット及びラジオイムノアッセイにより特徴づけられた。ほとんどのMoAb は、全ての3条件下、ヒトの本来のTP及び変性TPと反応した。MoAb の1つ、TP8-5G9は、TFタンパク質のルーチンな特製にうまく使用することができる。それは組織抽出物由来のTP活性を吸着し、ミリグラム量の特製ヒトTPを一定して与える。

MoAbの1つ以外の全ては、精製したヒト届TFの機能活性を強く中和する。いくつかのMoAbは、ヒヒ及びサルのTFと交換反応をすることが分っているが、相例的因子可の存在下、ラット、ウサギ、子かシ、イヌ、羊、又はブタのトロンポプラスチンにより開始した因子以欠損ヒト血族の凝集を、どの抗体も阻害なヒト血族の凝集開始は、どの抗体によっても超客を受けず、このことは、ヒトTF凝血活性の阻害は、因子などは「まるないという特益を支持する。

抗TFによるTF凝血活性の阻害に対する最も明解な原因は、 因子・VI・結合のブロックである。予想されるとおり、全部で 例6cで述べたように行った、ウェスタンプロット分析を、電気減動するサンプルとして、例3で述べたように講顕した、免疫類和性により卑難したねれて下、特製したヒトへモグロビン、又は、分子量機準を用いて行った。指示されているところではジスルフィド結合の選元のため、サンブルパッファの中に50m級クサゴスレイトールを含めた。ウェスタンプロットを、非免疫化ウサギ I & G、 従来の方法で調製したウサギ抗ねロTF I & G 又は、ダコ(Daco)(カリホルニア、サンタバーパラ)社から入手したウサギ抗ヒトへモグロビンI & G を用いて、示されているように免疫反応した。最初の2つのI & G 剪製物は、例7で述べたように単離したMAPS-IIである。

上で述べたウェスタンプロット分析の結果は、第18団に示した。抗れ u TF I g G は、運元型 h u TF の 4 7 k D a の バンドとの み免疫反応を起こし、1 2.5 k D a の バンドとは反応しなかったが (パネルA、レーン3)、一方、同 I g G は、非運元型 h u TF の 5 8 k D a 及び 4 7 k D a の 両 バンドと免疫反応を起こした (パネルA、レーン4)。これらの結果は、5 8 k D a へテロダイマーの 4 7 k D a 放分としての h u TF の 同定と一致している。 筑へモグロビン 1 g G は、非運元型 h u TF サンブル中の 5 8 k D a バンドとの み免疫反応を起こし、4 7 k D a の モノマーとは 反応しなかった (パネルB、レーン4)。 しかし、 銃へ モグロビン 1 g G は、 運元型の h u TF サンブル中の 1 2.5 k D a バンドと免疫反応し (パネルB、レーン3) また、1 2.5 k D a の 特製した ヒトヘモグロビン・タンパク質と免疫反応した (パネル B、レーン2)。 非免疫 ウサギ I g G との 反応は なかった。

上記の結果は、非違元型カロTFの 5 8kDa の分子は、ジスルフィド結合でヘモグロビンと結合した 4 7kDa カロTFから

23個の抗凝血 (中和性) MoAb は、TFの基本的レセプター 機能と一致して、J82細胞への因子リノは3の特異的結合を妨 ぐ。さらに、このことは、因子VI結合及び、因子X3形成速度の 限客のハーフ・マキシマルが同じ1gG構度のときに起こる、選 択した特製MoAb の投与演定においても実証される。

ヒトTFに対するMoAb は、最近、カーソン(Carson)等 (ブラッド (Blood)、7 D 他、4 9 D 頁 (1 9 8 7年)) によ り、これを直接試験したのではないが、因子短/短ュ結合の妨害 によることは明白に、TF活性を阻害するものであると報じられ た。24個のここで述べられているM o Ab のうちの23個が、 TF活性を強く中和するという知見は往目に値する。猫のヒト蔵 血タンパク質に対するM o Ab を用いた当出職者の研究室で行っ た実験は、少数の割合のものが機能活性を中和するというもので ある。基本的TPとの交差反応性が合む、反応性が各々異なるこ とから、ハイブリドーマ全てが兄弟クローンであるとは思えない。 さらに、進行中のエピトープマッピング研究は、この種のMoAb に少なくとも3つの別々の非競合抗体結合部位が確認されること を示している。それゆえ、TFに対するMoAb を中和する大部 分のものは、機能にも関係するわずかな免疫的に優勢なエピトー プによるものでもないらしい;事実、ホブ (Hopp) 券により (モレキュラー・イムノロジー(Noi. Imauso).) 2 0 色、 4 8 3 頁(1983年)) TFのアミノ政紀列は、多くの抗原活定基を 含んでいることが報告されている。

小さいサイズのTFは、なぜ、そんなに多くの抗TF MoAb が因子VI/VI a 結合をブロックするのかを部分的に説明している。 TFは、 cDNAクローニングにより、グルコシル化を除いて、 25kDa の細胞外ドメインをもつことが予想されている。それ

持表平1-503438(31)

ゆえ抗体及び因子は「Vis 分子は、より小さいTFの細胞外ドメインへの結合に立体障害を示しことになる。この立体障害仮説は、TF上の炭化水素質がおそらく機能には必要ないことから(ナカムラ(Nakamura)、トロンポペモスタチス(Trom. Remost.)58巻、185買(1987年))、コンカナベリーノAはTF活性を阻害する(ビトリック(Pitlick)ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clim. Invest.)55巻、175買(1875年))という観察と一致する。

それは、種々の相胞及び組織により発現した因子で依存凝血活性は、間様の機能をもつ、1つ以上の分子種に寄因するということに、いくらか関連している。しかし、M。Ab TF8-509は祖脇及び胎盤抽出物及び溶解した繊維芽細胞、腱脱が心細胞及び末梢単核細胞の凝血活性を定量的に図書する。完全ではないが、これらの結果に、現にTFに寄因する細胞性凝血活性は、同一ではないときも抗原的に関連しているという結論を支持している。このことは、TFに対する単一の遺伝子がおそらく存在しているという知見と一致している。

最近、敗血性ショックの致死効果は、凝血プロテアーゼカスケードにおいて、中間段階での役割を果している抗凝血タンパク質、活性化したタンパク質にを注入することにより、ヒヒにおいて妨ぐことができることが示されている。本研究は、TF活性を阻害するM。Abは、凝血プロテアーゼカスケードの関始のプロックにより、それらが、血管内凝血の病理学的活性化と退席関連している、血質凝血因子の情費を妨ぐので、生体内で、非常に特異性の高い抗凝血剤であることを示している。

例4で述べた5 8kD。型のカロTFは47kD。のTFタンパク質と、現在では免疫化学的にまた部分的アミノ酸配列により、

抗丁ド抗体との反応で観察された。5 8kDa パンドの一部を含む、これらマイナーな分子機は、丁ドと他の未同定タンパク質問で形成された、混合ジスルフィド結合物を示している。

特別の態様及び例を含む先の明細は、本発明の説明を意図したものであり、これを限定するものではない。多くの他の変化や、 修正が、本発明の精神や範囲を逸融することなく行うことができる。 へモグロビンのアルファ镇と同定されている、およそ125kDaのポリペプチドの、ジスルフィド結合で結合しているヘテロダイマーであることが示されている。58kDaのヘテロダイマーが、単群の途中で形成されているらしいので、58kDaのバンドは、天然の細胞性TFのヘテロダイマー型であるという以前の推察は壊りてあるだろう。

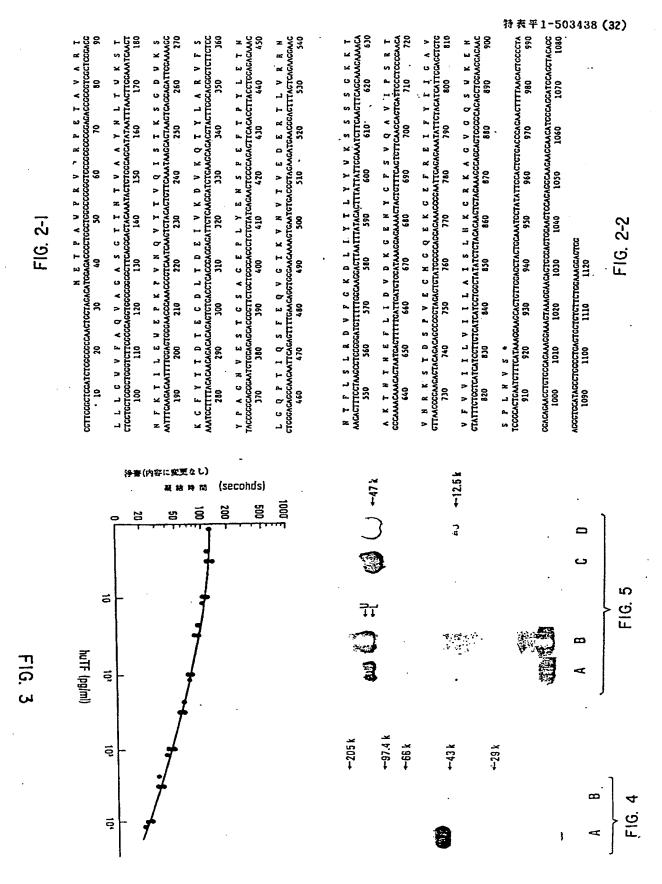
ヘモグロビンのアルファ鎮は、1つのシスティンをもち、また TPは、 cDNAから、その細胞質ドメインに1つのシステイン を有することが予想される。またTFは、細胞外ドメインには4 個のシステインをもつが、TF機能が還元により失なわれること から、少なくとも2つが護内ジスルフィド結合に使われているは ずである。TFの細胞質ドメイン中の1つのシステインは、ほと んどの和胞質ゾルタンパク質中のシスティンのように、違元型で 維持されているだろう。この(TFの他のシステインは、ありそ うもない) システインは、細胞溶解後、混合ジスルフィド形成の ため容易にアクセスでき、そして、単點設作間での酸化で、TF の細胞質及びヘモグロピンのシステイン間でジスルフィド結合が 形成すると提唱される。この結論は、ヘテロダイマー形成は、明 らかに時間依存性があり、脳アセトン初来由来のTFの界面活性 刑抽出と、免疫親和性マトリックスへの結合との間の時間を小さ くすることが、得られるヘテロダイマーTP黄を彼少させる観察 を支持する。推定される96kDa のTFダイマーも、単群の際 周様のメカニズムで形成するであろう。

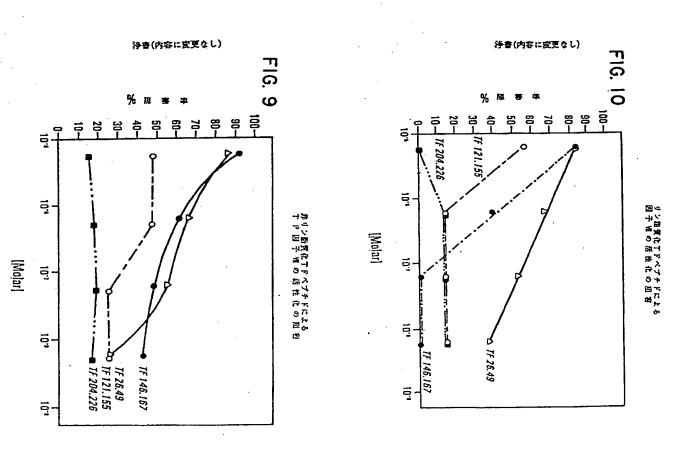
抗ヘモグロビン抗体カラムは、3つの5 8kDa のヘテロダイマーを特異的に結合したが、免疫競和性で特製したTF調製物中に試験できる高分子量機全てを定量的に除くことはなかった。47kDa 以上の分子量をもつ他の底跡量のマイナーバンドは、

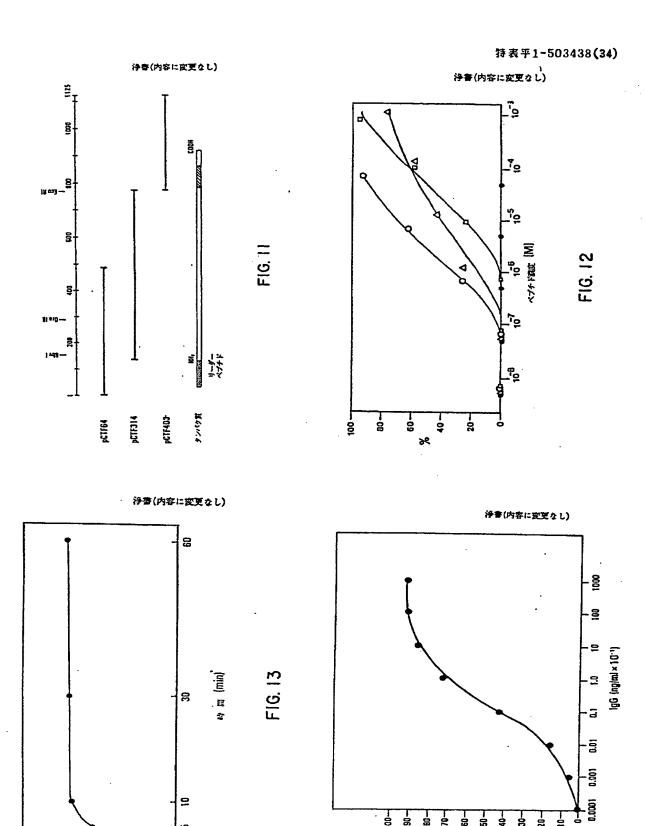
	-30	-20	10
ME	TPAWPRVPRP	ETAVARTLLL	GWVFAQVAGA
10	20	. 30	40
SGTINTVAAY	nltwkstnfk	TILEWEPKPV	novytvoist
50	60	70	80
KSGDWKSKCP	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPA
90	100	110	120
GNVESTGSAG	EPLYENSPEP	TPYLETNLGQ	
130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRRNNTF	LSLRDVFGKD	LIYTLYYWKS
170	180	190	200
		KGENYCFSVQ	
		MOENTCISVO	AVIPSRTVNR
210	220	230	240
KSTDSPVECM	GQEKGEFREI	FYIIGAVVFV	VIILVIILAI
250	260		
BLHKCKKAGV	GQSWKENSPL	NVS	

FIG. I

٠.





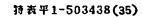


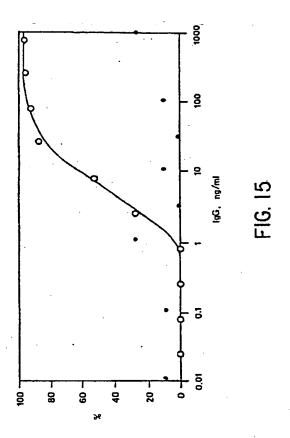
\$ %

6

2

8





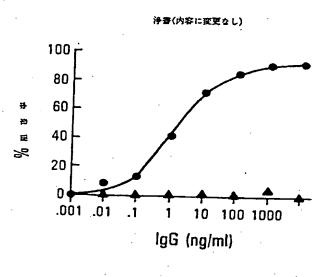
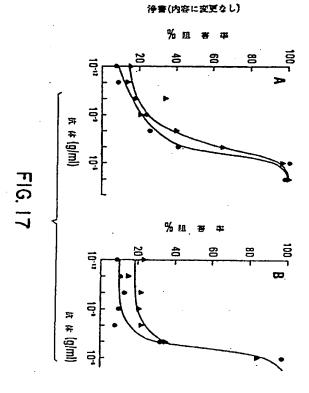
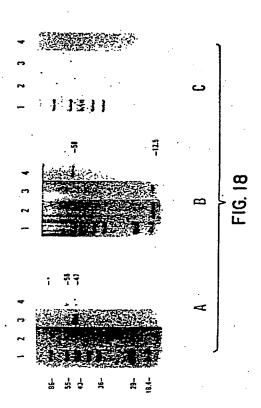


FIG. 16





持表平1-503438 (36)

1-38 400 42-38

inter tigstyment bysaupring plan my standardmak flung peer or treams, note pee not at speriod and has produced and \$305 To progressions for prompting or troopy analysing the

**** Advisory of philosopy specifics the object of Chief to Annabased State of Chief to Chief to Without the Annabased State A to 4. Seri-way this foundating towal are one as a colour beyond where the series are and a to a man one breat series the series as the colours of series on versions and here are the series as the property and the series of the series

The same of Atl

0 9 AUG 1988

INC (4): COM 22/04; Cl2c 13/00; COM: 7/06, 7/06, 7/00, 15/00; COM: 33/51; CI2C 21/00; COM: 23/00; 39/395; GOM: 33/51; CI2C 21/00; 21/02; Mix 39/00; 39/395; GOM: 33/51; CICC 21/00; COM: 33/51; GOM: 33/51; GOM: 33/51; CICC 21/00; COM: 33/51; GOM: 33/51; GOM: 33/51; CICC 21/00; COM: 33/51; GOM: 3

As Older Tr. No. "Affinity purification of fumn tissue factor: Interaction of fumn tissue factor: Interaction of factor VII and tissue factor in detergent micelles" From Section of the Kational Academics of the Kational Academics of the Kational Academics of the Mational Academy of Sciences of the United Academy of Sciences of the United States of America (Washington, D.C., USA). See entire document.

G.J. BROIL, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor", The Journal of Biological Chemistry, Volume 20, pages 1097-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Baltiager, MD, USA). See entire document.

CA File: 1967-1988 BIOSIS File: 1967-1988

¥

22 JUNE 1988

152/08

M. BORUMBOTS COMMITTED TO BY RELEVANT

* Second Timestons of other pro-"A" delighteen redwest in general later to "
"I select second in general later to "
" prince placement and purposes of an other the commonweal " prince placement and purposes of an other the commonweal " prince placement and purposes of the commonweal " prince placement and the common placement part of the possible of the purposes of the placement part of the placement or placement of the placement part of the placement or placement of the placement part of the placement or placement of the placement part of the placement of the placement or placement of the placement part of the placement of th

Can/dama Service

124/25; 425/7,66,70,71,97,172.1-172.3,243,253,320;

114/2,6,12-15,322; 136,7234-337,311,367,536,737,513,8.6,11,12

22,95,99-106; 436/303

Determined for Determine Service Annu Françoise Partners of Partners Service (Service)

processor of the Determine Service Françoise Partners (Service)

乎 號 袖 正 書 (方式) **1.** 8.31

> 平成 月

符許庁長官 育田文 数 段

PCT/US88/00998 1.事件の表示

2.発明の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA 断片・ポリペプチド及び抗体

3.補正をする者

事件との関係 出 闡 人

スクリップス クリニック アンドリサーテ ファウンデーション

4.代 遵 人

Ħ

5.補正命令の日付

5.補正の対象

7. 補正の内容



住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 電話(代)211-8741 氏 名(5995) 弁理士 中 平成1年8月22日 明細書及び請求の範囲の翻訳文 図面の翻訳文(第3、9、10、 11、12、13、14、16、17図) 別紙のとおり 明細書、請求の範囲の誤訳文及び図面の翻訳文 (第3、9、10、11、12、13、14、16、17図 の浄書・(内容に変更なし) **全**①

TOTAL SERVICE CONTROL OF THE PROPERTY OF THE P			
*	J.S. KITTLER ET AL, "Identification of a CDNA clone for bovine tissue	1-3s	
	implor, receiving proceedings.	42-54	
	Volume 45, page 1639, abstract no. 927, published May 1986 by The		
	937, published May 1986 by The Pederation of American Sociaties		
	for Experimental Biology		
	(Bethesda, MD, UEA).		
	See entire document.		
(,p	E.M. SCARPATI ET AL, "Human tissue factors cDNA cloning, primary	11,33-24	
. E.	factors cDNA cloning, primary	and 17	
:		2-10,13	
÷	localization", Federation,	16.16-	
į	abstract no. 1846, published	39 and 42-58	
•	Proceedings, Volume 46, page 2242 abstract no. 1846, published 1 May 1987 by The Federation of	1 30-20	
	American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA).		
:	See entire document.	;	
2.1		!	
- 	J.H. HORRIESEY ET AL. 'Molecular	1-0,44-	
	cloning of the cDMA for human tissue factor, Federation	13 and	
•	Proceedings, Volume 46, page 716, abstract no. 2338, published 1 May 1987 by The Pederation of American Societies for	4	
ł	abstract no. 2338, published	14-16.	
•	of Aberican Societies for	. ye-3e	
!	EXPERIMENTAL BLOLOGY (Bethasos)	42-58	
:	MD, USA), See entire document.	i	
	S.D. CARSON ET AL. "Monoclonal	: 1-3b	
•	Entibodies against boving tissue	lang	
:	factor, which block interaction	1 42-54	
•	with factor VIIa", Blood, Volume 66, pages 152-156, published July 1985 by the American Society of Rematology, Grune & Stratton, Inc.	;	
- !	July 1985 by the American Society of	:	
	Hematology, Grune & Stratton, Inc.	ì	
	(Orlando, Fla., USA), See especially pages 152-155.	1	
	peq== 151-133.	•	
	J.E. HORRISSEY ET AL, "Molecular		
	cloning of the cDNA for tissue	113	
	factor, the cellular recentor	ang 17	
	for the initiation of the	6-1U.	
	congulation protesse cascade*, Cell. Volume 50, marga 128-135	14-16	
	published 3 July 1987 by Cell	ld-3e,	
	Cell, Volume 50, pages 129-135, published 3 July 1987 by Cell Press (Cambridge, Mess., USA). See entire occument.	42->6	

X.P		
Y,P	Z.M. SCARPATI ET AL. "Ruman tissue factor: CDWA sequence and chromosome localization of the gene", Bio- chemistry, Voluma 26, pages 5234- 5238, publishes 29 August 1987 of the American Chemical Society (Columbus, Chio USA). See entire document.	1,12-14 anc 17 2-10,15 16, 10-36, and 42-56
1/7	·	
	VATIONS WHISE CERTAIN CLAIMS WINE FOUND UNSCARCHABLE !	
1. C Enter Sec	, Ordinals this ridius to hadorn model IV per regularly sp ga deprinces as as	······································
Cla Cla Cla Cla Ppo a D uns	so 33-41, the property of the control of the contro	cording to an antibody. scites a directed to incomplete and
ž		
	e.esj.	
	SACE VATHER WHIRE LIMITY OF ERVENTION IS LACKED !	
I. Class II. Class III. Class	**************************************	
1. Class 11. Class 111. Class 111. Class 111. Class	Audy Anymon where unity or invention in Lackman and between Anima than make anima is be ins 1-20 and 42-52. V. Claims 29-3. ins 21-24 and 38. and 53-58. aim 25. ins 20-28 and 35.	4, 36, 37
I. Class II. Class III. Class III	AAG) WYSTHER DWINE UNITY DY INVENTION IN LACADIA! WISTONIA AMERICAN THE SUBSECTION IN THE SECOND IN THE SEC	
I. Clair II. Clair III. Clair III	Audy Anymon where dimity by inventions in Lackmen 1 and Benning Animaly lines maked emissions in the interest of sections in 1-20 and 42-52. U. Claims 29-34 aims 21-24 and 38. aims 25-28 and 35- aims 26-28 and 35-	4 , 36 , 37
I. Clai	Audy Available Writing White Description in Lacadies At Sentency America White Description in Lacadies Into 12-20 and 42-52. U. Claims 29-3 Into 21-28 and 38. and 53-58. Also 25. Into 20-28 and 33.	6, 36, 37
The beneat I. Claim II. Claim III. Claim III	AAGE VATIFIED BY HERE MINTY OF INVESTMENT IN LACKERS! AND 12-20 and 42-52. V. Claims 23-3. Ins 21-24 and 33- and 53-58. ALM 22-3 Ins 20-25 and 35- Ins 20-25 an	6, 36, 37

	Cases of Bernaryon, was reception where operations, of the secretar passents of	Después de Capita des
Y	A.B. AEBERSOLD ET AL.	21-3
1	"Electroblotting onto activated	42-40
	glass", The Journal or Biological	A 12.03
	Chemistry, Volume 261, pages	53-20
	Chambery, volume 201, pages 1906	
	4229-4238, published 25 March 1906	
	by The American Society of	
	hiological Chemists, Inc.,	
	Maverly Press (Baltimore, MD, USA).	
	See especially page 4229.	
Y. P	Chanical Abstracts, Volume 107,	1-36
2.5	where to tested 26 October 1987	FUG
	(Columbus, Ohio, USA), S.D. CARSON	42-50
-	ET. AL. "An inhibitory monoclonal	
	antibody against human tissue	
	Springer adernat traver second	
	factor", see page 539, the Abstract No. 152425h, Blood	
	the Ameriacs No. 1324398, Blood	
	1987, 70(2), 490-3(Eng.).	
	Chemical Abstracts, Volume 108.	1.11-44
X.P Y.F	Number 9, issued 29 February 1909	anc 17
Y,P	Dumber 9, 1980ed 29 Fronts	2U.
	(Columbus, Ohio, USA), K.L. FISHER	15,16
	ET AL . "Cloning and expression	10-30
	of human tissue Inctol CLANA , see	AAE
	pages 195-196, the Abstract No.	42-35
	70091c, Thromb. Res. 1967, 48(1),	42-30
	89-99(Eng.).	
	A. HIMMEN ET AL. "Transformation	1-3e aug
Y	of yeart", Proceedings of the	42-30
	National Academy of Sciences	
	USA, Volume 75, pages 1929-1933,	
	USA, VOLUME /S, Pages 1325-1327	
	published April 1978 by the	
	National Academy of Sciences or the United States of America (Washington	
	United States of America (washington	
	D.C., USA). See especially paye	
	1929.	
-	M. HOUGHTON IT AL. "The amino-terminal	1-34
Ŧ	sequence of human fibroblast interferon	ane
	as deduced from reverse transcripts	42-50
	neigh completic Olidorucleotice	
	DESCRIPT WITH PINCHESS CARRIED	
	primers', Bucleic Acids Research Volume 8, Number 9, pages 1913-1931, published May 1950 by IRL Press Limited	
	VOLUME E, NUMBER S, PROPE TOTAL PROPERTY AND THE	
	(Oxford, Ingland). See page 1913.	
	(Oxidid, tultum). Des bals :	
	•	

第1	頁の	続き	ř		
(S)	lnt.	Cı.	ı	識別記号	庁内盔理番号
C	07	K	7/08 7/10 13/00		8318-4H 8318-4H 8318-4H
C	12 12 01	242	5/00 21/02 33/53	٠.	B-8515-4B 6712-4B D-7906-2G L-7906-2G
	12 12 07	PRK	33/577 21/02 1:91) 99:00		B -7906-2G

優先権主張 Ø1987年6月25日匈米国(US) ⑨067,103 Ø1988年3月9日匈米国(US) ⑨165,939

⑫発 明 者 モーリジー ジェイムズ エイ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン ディエゴ カチ ミノ キオスコ 7955

特許法第17条第1項又は第17条の2の規定 による補正の掲載

昭和63年特許願第50355号(特表平 1-503438号、平成 1年11月22日発行公表特許公報)については特許法第17条第1項又は第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。

	Int.Cl.		識別 記号	庁内整理番号
	C12N	15/09	ZNA	•
	C07K	7/06	'	B318-4H
		7/08		8318-4H
		14/435		8318-4H
		16/18	}	8318-4H
	C12N	5/10		-
	C12P	21/02		C-9282-4B
	•	21/08].	9161-4B
. //	ASIK	39/395	}	N-9284-4C
	G0 1N	33/53		L-7055-2J
				D-7055-2J
		33/577		. 7055-2J

(続きあり)

手 続 補 正 1

7.3.28 平成 年 月 日

特許庁長官 高 島 章 段

1.事件の表示 昭和83年特許収第508555号

2.発明の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ポリペプチド及び拡体

3.補正をする者

事件との関係 出 職 人

名 称 スクリップス クリニック アンド リサーチ

4.代 摄 人

住 所 東京都千代田区丸の内 3 丁目 3 番 1 号

氏 名 (5995) 弁理士 中 村

5. 補正命令の日付 自 発

8. (木物正により請求の範囲に記載された請求項の数は合計「5!」 となりました。)

7.補正の対象

別組書および請求の範囲の指

8. 緒正の内容



平成 7.12.20 発行

Int.Cl.	識別配号	庁内整理番号
		A-9281-4B C12N 15/00 -ZNA B-7729-4B C12N 5/00
		• ,
•		٠.

- 1. 請求の範囲を別紙の通り補正する。
- 明報書64頁7行の「BLOTTO」の後、『PBSにおける、5メ m/ッ 非施助 乾燥ミルク、0.01%アンチフォームA (ングマ親)、及び0.0001%マー チオレート (serthiolate)] 1 を押入する。
- 3. 同88頁18~14行の「TF8-5G9……TF8-5G9」を「TF 85G9、TF8-5G9及びTF8 5G9」と補正する。
- 4. 両89頁19行の「8a」を『2 A』と補正する。
- 5. 町88頁20行の「8」を「2A』と補正する。
- 6. 同70頁8行の「TP8-589」を『TP8-5G9』と補正する。

請求の報題

- (1) ヒトの組織因子重填タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する配列を含 む、わずか12000ヌクレオチド塩基均を含むDNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、以下のアミノ散残基配列を有するタンパク質をコードす る、錆求の粒囲(I)配敵のDNA断片。

-			
10	20	30	. 40
SGTTNTVAAY	nltwkstnfk	TILEWEPKPV	NOVYTVQIST
50	60	. 70	80
KSGDWKSKCP	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPA
			•
90	100	110	120
GRVESTGSAG	eplyenspep	TPYLETNLGQ	PTIQSFEQVG
		•	
130	140	150	160
TXVNVTVEDE	RTLVRRNNTP	LSLRDVPGKD	LIYTLYYWXS
170	180	190	. 200
SSSCRRTART	NTNEFLIDVD	KGENYCPSVQ	AVIPSRTVER
210	220	230	240
KSTDSPVECH	GQEKGEFREI	PYLIGAVVPV	VIILVIILAT
	•		
250	260		
SLHKCRKAGV	GQSWKENSPL	NVS	•

平成 7.12.20 発行
(3) 上記標連通伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、南次の範囲(2) 記載のDNA断片。

	S C T T K T V A N Y H L T U K S T TOCCCACTACANTACTOCCACCACTACATTACTTCACATTCACTTCAC	M F K T I L E W E P K P W H Q W Y I V Q I S T K S C D W K S ANTICAACACAATITICAACCCAAACCCAAACCCAAACCCAACATICAAATACTCAAAAACCASO 200 210 220 250 260 270	K C F Y T T D T E C D L T D E I W E D Y E Q T Y L A R W F S ANTICITARACACACACACACACACACACACACACACACACACACA	Y P A G N V E S T G S A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N TACCOCCACACATETICACACACACACACACACACACACACACACACACACACA	L C Q F T I Q S F E Q V C T K V N V T V E D E R T L V R N CTOCRACACCACACATTCAAACTTTATCAAACTACAACAACAACA
	. < ઉં	~ §	~ ₹	آ کو ت	, j
	₹	. ⊾ <mark>≵</mark>	ွှဲ့ပွဲ	۵ کے	_ შ
	> 6 3	~}}	> É B	្តខ្លួ	× ₹ 5
	وا ⊶	> [;	- <u>5</u> "	~ § ~	+ 8 °
	≖ 🖁	- 5	¥ §	m g	> g
	150	~ ¥ £	> <u>5</u> 8	7 8 9	* ¥ 8
	. 3	> 5	3	7 💆	> 5 ^
	_ S	Z g	78	~ 8	× 3
·	្តិ	742	188	្តីខ្លួន	1,386
		~ 8	្មវិ	< 5	, E
		×₹	- 8 - 8	2 S	0 3
		~ ខ្លួន	ပဋိဒ္ဓိ	ည်နိုင်ငံ	# ₹ £
		ᄦᅎᆑᇎ	w gg	⊬ §	~E
		⇒ B	⊢ ğ	က ပို့	ω Ş
		្តីខ្លួន	\$ £ 6	# 35 S	~ £ 5
		ΞĒ		<u> </u>	7 \$
		- ₹	7 8 7	- 3 - 3	_ 3
		™ § 8	"ES	1 2 5 C	283
		~ E	. <u>B</u>	≂ ႘	_ g _
		≈ ¥	× {	<u>≻</u> 22	_ g
				•	•

(4) 上記構造遺伝子が、以下のアミノ酸技差配列を有する可熔性ヒト組織因子賞 娘タンパク質をコードする、錆水の範囲(1)記載のDNA断片。

		•	
10	20	30	40
SGTTNTVAAY	nltwxstnfk	TILEWEPKPV	· NQVYTVQIST
		:	
50	. 60	70	. 80
KSGDWKSKCP	YTTDTECDLT	DEIVXDVKQT	•
			. • •
90		110	. 120
			•
GNVESTGBAG	eplyenspep	TPYLETNLGQ	PTIQSFEQVO
			?
130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRRHNTP	LSLRÖVPGKD	LIYTLYYWXS:
170	180	190	200
SSSCKKTART		KGENYCPSVQ	
•			
210			•
KSTDSPVECM	GQEKGEFRE		

T D S P V E C N C Q TACACACACCCCTAGACTCTATOCCCCA 740 750 750

(5) 上記線速速位子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、鏡水の販照(4) 記載のDNA断片。

- (6) 上記配列(第1の配列)の5°末端に連続し、かつ上記タンパク質のアミノ 末端に結合した、アミノ酸残落リーダ配列をコードする第2の配列も含み、か つ政第1及び第2のDNA配列がヒト組織因子重頼前駆体タンパク質をコード する混成構造遺伝子を規定する、請求の範囲(1)配載のDNA断片。
- (7) 上配混成構造造伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(8)記載のDNA斯片。

10	20	30	40
SGTTNTVAAY	NLTWKSTN PK	Tilewepkpv	Ngvytvqišt
50	. 60	70	80
KSGDWKSXCP	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	Ylarupsypa
90	100	110	120
Gnvestgsag	EPLYENSPEP	TPYLETHLGQ	PTIQSFZQVG
.130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRRNNTP	LSLRDVFGKD	LIYTLYYWXS
170	160	190	200
SSSGKKTAKT	NTNEPLIDVD	KGENYCPSVQ	AVIPSRTVNR
. 210	220	230	240
KSTDSPVECH	GQEKGEPREI	PYLIGAVVFV	VIILVIILAI
250	260		

SLHKCRKAGV GQSWXENSPL NVS

(8) 上記提成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、精攻の範囲 (7) 記載のDNA断片。

ードする、請求の範囲(8)配載のDNA断片。

	-30	-20	-10
. ME	TPAWPRVPRP	ETAVARTLLL	GWYAQVAGA
10	20	30	40
SGTTNTVAAY	nltwkstnpk	TILEWEPKPV	NOVYTVQIST
50	60	70	80
KSGDWXSKCP	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARVPSYPA
90	. 100	110	- 120
Gnvestgsag	PPLYENS PEP	TPYLETNLGQ	PTIQSPEQVG
130	140	. 150	160
TXVXVTVEDE	RTLVRRNNTP-	LSLRDVPGKD	LIYTLYYWXS
		•	
170	180	190	200
SSSGKKTAKT	ntneplidud	KGENYCFSVQ	AVIPSRTVNR
210			•
XSTDSPVECM	GQEXGEPRE		

(10)上紀混成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有

I I C A V ATCATTCCACCTCTC 800 810

Q E K G E . F R E CAGACANACACANA

TCAACCACTCATTCCTCCCCACA

N T P L S L R D V P C K D L I Y T L
AACATTECTAACCTCCCCCCATTITICCCAACACTTAATTAATACACT
550 550 550 550

Q S V K E N CACACCTCCAACCAAC B90 900

V P V V J I L V I I L A I S L H K C R K A C CINITICICATANTATATANTATANTATANATANATANAAAGCAAAA 120 130 870 870

S P L N V S
TCCCACTCANTCTTTCA

2数のDN	A断片。				
9.0	. # 0	ပွာခ	u o		vo
- 3 -	F § #	~ § ≈	~ F %	~ ≨≎	₹ ₹
<u> د</u> ک	A D	¥ ≴	~Ē	F 2	≈ Ç
< b	" ≶"	> E	> Ĕ	₩ Š	≖Ş
> ខ្លី ឧ	2 <u>8</u> 8	- 38	* § §	ម្តី ទី	> ក្តីខ្ល
< દુ	+ § _	ပစ္တဲ့``	< ऄ	~ <u>₹</u> *	~}"
μŞ	- È	. ν ξ <u>.</u>	٦Ě	# £	⊢ 5
ω <u>ξ</u> ,	*₹.	×≸ુ	~ ¥ a	۲Ą	≃g°
~8^	~ 12 %	⊬ ₫ %	⊢ 84	~ 5 €	≈ § %
≈ 8	ৰ টু	ა გ∙.	~3	ખ છું	a [5
~8	∢ ફું	ᅲ⋚	≥ 3	⊾ ફેં	ω.ặ̃
N E T P A V P R P P F F F F F T A V A R T ATGRANGE CONTROCT CONTROCT CONTROCT OF SO 40 50 60 70 80 80 90	> 55 82	~ 3 %	> 5 S	»ភ្លួន	> 5 3 4
≈ §	۲	> E	₽ ₹	≖ § `	rğ"
~ છુ	×¥,	⊢ ਉ	׊	₩ Ş	. > 55
2 g 2	누설일	⊁ฐ¤	> Ë &	~ 🖺 9	= 5 g
~ છું	+ Q -	> 25 ~ .	-Ę~	764	> 15 x
⊷ <u>5</u>	•g .	∽ફેઁ	₩ Š	٠Ĕ	×₹
+ g	∞ដ្ឋ	≈\$ ₀	-8	^ω Š	⊢ ₫
~ 3 3	-ខ្ពុភ	> 2 2	₽åĕ	ပဋိဒိ	မည့် နှ
ת	မၓ္တ	~ 8	7 g	έğ	> F
-	<₿	ך	ΔŠ	ωĘ	ο <u>ξ</u>
	> B. S	~ 82	ညီဋိ	ပည္သန္တ	س <u>ک</u> ۾
	~ ჭ	ო ફુ	¤ S	⊢ި	- É
	≺ છું	> <u>ខ</u>	μŠ	νĝ	υĒ
	~ E S	a S S	6 8 6	₩ 5 0	030
	> 12 77	_ દુ≈	- 3 %	> E ~	- Ĕ 3
	> §	- Ę	₽§ .	= 5 ·	⊢ § →
	ပမ္က	⊬ğ	~ § ~	မရွိ	~ ຢູ່ _
	그렇을	~ 3 ×	~ E ‰	₹36	0 5 6
	7 B	~ <u>F</u>	ပ ဦ	~ 8	ပ ပို့
	L L C V V F A Q V A G A S G T T W T V A A Y W L T V F S T CICCICCTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	N F K I L E U E P K P V N Q Y Y T V Q I S I K S C D U K S ANTICAACACATITICCACICCCAACCCCCCCCCCCCCCC	K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V K Q T Y L A R V F S AMTICETTITACACACACACACACACACACACACACACACACACAC	YPACHVECONDECONDECONDECONDECONDECONDECONDECOND	L C Q P T I Q S F E Q V C T X V N V T V E D E R T L V R R R I ETCOCALOCACIONCANCANCANCANCANCANCANCANCANCANCANCANCAN

88 N T F L S L R D V F
AACACTTCCTAACCTCCCCCATCJITIT
S50 S60 S70

平成 7.12.20 発行
(13)上記標連通伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を育する、情味の範囲(11)

記載の組換えDNA分子。

S C T T R T V A A Y N L T U K S T T TAGGEGGTACAMITACTTCCCACATAMITAMCTTCCAMITAMCTTCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCCAMITAMCTTCAMITAMCT	H F K T I L E W E P. K P V N Q V Y T V Q I S T K S C D V K S ATTEMACACACTACACTACACTACACTACACTACACTACA	K C F Y Y T D I E C D L I D E I V K D Y K Q T Y L A R V F S ANTICITITAGACACACACACACACACACACACACACACACACACACA	Y P A G H V E S T G S A G E P L Y E M S P E F T P Y L E T K Heccelocamisticaralacacitatectrochacacitatrachacitacacacacacacacacacacacacacacacacacac	L C Q P I I Q S F E Q V C T K V H V T V E D E R I L V R R R TECCACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
S C T T M T V A A Y N L T U K S T CACCACTACAAATACTCTCCCACATATAATTTAACTTCCAAATCAACT 140 150 150 160 170 180	¥ ≩ "	₽ <u>E</u>	⊬ Š	≈ g ¯
∡ Š́	> 월	> 15	≈ S	≈ ઇૄં
2 g c	254	∝82 ×	~ g 3	> ម្លួន
Ā.	ပစ္လို 🤻	< ડું ″	≻ Š →	٦ξ~
¬₹	» <u>ទ័</u>	٦£	ج لج	۲Ų
.≖ Šo	¥Ş″.	~ ¥ ~	٠Şi	≖ 8 a
7 I I	rğa	~ તું ૠ	마닭다	ᄱᅕᆠᇰᄄ
< গ্র	~ ဂ္ဂ	ø §	¥ 8 .	₽ ĬŞ
< গু	~ ₹	×₹	~ ყ	ა ჴ
> 65 53	~ ₹ %	× 5 5	~ ដូនូ	> ξ ដ
וין א	> 5	a t	z Ş	⊢ ဗို
≖ ₹	Ļ	¥ 3́	∞ 8	ي ح
+ 50	-> ¥ 8	> 5 8	≻	∓ 5 8
+5,7	? 💆 "	- E.	7 £ 4	۳ ي
ပမ္သ	~3	_ ≅ ₹	~ છુ	× } ·
ν ig S	* 3 a	283	™ ž g	₽ Ž ģ
-	> हु ∼	- § ~	ខ ខ្លី ទ	က ရှိ 🍨
	- 8	7 5	٧ يو	و ا
			" E e	3 ė
•	8≈		.082	្តីទី
	_ R	_3	[§]	<u>.</u> [
	_ 5 2	232		25
	្តិដ្ឋ	_ 3 E	25 %	- E-4
	"Ę	_ ₹	- 5 - 5	⊢ ₹
	NFXTILEUEFRPU NQVYTVQISTKKSGDVKS UNITCARCACANITICGARGACCCAAACCCAATCAACACTAATAAAAAAAAAAAA	~ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\	Y F A G H V E S T G S A G E F L Y E H S P E F T P Y L E T R **********************************	- 3
	× 3 2	rE≋	< 9 %	~ × × ×
	٣Ē	၁ ၌	<u>- 8</u>	မ ရွိ
	2 5 3	⊯ Š	≻ 🧸	교류

(14)さらに、上記第1の断片の5′末端に返続し、かつ上記タンパク質に結合し た、アミノ酸機基リーダー配列をコードし、かつ政第1及び第2のDNA新片 が、上記タンパク質の前駆体をコードする提成構造遺伝子を規定する、請求の 範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。

(15)上紀混成構造遺伝子が、以下のアミノ散残基配列に対応するアミノ酸残基配 列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、請求の範囲 (II) 記載の 組換えDNA分子。

(11)ピト組織因子重験タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する第1の
DNA断片に機能的に結合したベクターを含む組換えDNA分子。
(12)上記標達遺伝子が、以下のアミノ動残差配列を有するタンパク質をコードす。

(12)上記構造遺伝子が、	以下のアミノ酸残差配列を有するタンパク質をコードす
る、請求の範囲(11)	記載の組換えDNA分子。

10	20	. 30	40
SGTTNTVAAY	NLTWKSTNPK	TILEWEPKPV	NQVYTVQIST
		•	
50	60	. 70	. 80
KSGDWKSKCP	YTTDTECDLT	DEIVKDVKQT	YLARYPSYPA
	•	•	
	:		
90	100		120
GNVESTGSAG	eplyenspep	TPYLETNLGO	PTIQSPEQVG
	•		
	. •	•	
130	. 140	. 150.	160
tkvnvtvede	RTLVRRNNTP	LSLRDVPGKD	LIYTLYYWKS
	•	•	
170	160	190	200
SSSCKKTAKT			
SSSCANIARI	MINEELLIDAD	KGENYCFSVQ	AVIPSRTVNR
	•• :		
210	. 220	230	. 240
KSTDSPVECM		PYTIGAVVPV	
,	officer ver	TITIONVIEV.	ATIMATIMA
	• • •	: ·	
250	- :. 260		
SLHKCRKAGV	GOSWKENSPL	พงร	•
	•	•	

H T F L S L R D V P G K D L I Y T L Y Y W K S S S G K K T AGACTTCCTAGGGATCTTTTGGGAGGTTATTTATAGGATTTTTATAGGAACTTCAGGAACAAAAA SSO	A K T H T H B F L I D V D K G E H Y C F S V Q A V I F S R T CCANANCACACACACACACACACACACACACACACACAC	V N R K S T D S P V E C N G Q E K C E P R E I F Y I I G A V GTTAACCCCAAAACACCAAAAATTAACAAAAATTTAAAATATTAAACTTTACACCTGTG 7700 780 780 810	V F V V I I L V I I L A I S L H K G R K A G Y G Q S U K E N CTATTICTGCTCATGATGATGATGCTGCTATATGAGAGTGTAGAAGTGCAAGAGTTGAAAGAAGTGAAGAGATGAAGAAG 820 830 830 840 850 850 850 870 880 890 990	
∡ ₹	∝ છું	< Ö.	ო წ.	
~ ₹	n Si	ပဋ္ဌဲ	¥.≨	
ပပ္ပိုင္ဂ	ុ ក8្ន	~£8	⇒ <u>2</u> 2 g	
ນຽັ	, -£,	~ £ ~	∽ၓၙ [ႜ]	
~ P	· > 25	≻ 5 2	တ္မွ	
ᄶᅒୂ	. ∢§ີ	"F"	٠ <u>ڳ</u>	
» ដូទ	-35	· - 2 2	> £ \$	
× 3	> Ē	ա.≩.	မ ရွိ	_
⊸ છે	νĒ	a og	۷ ي	
> <u>₹</u> 8	~ 55°	ក្ខិន្ត	×85	
~ \f			∝ ₹ *	
⊒ Ē	₹ 5	္မမွ	ິ ≦	
r d o	~ 5°	¥ ¥ ₀	7 5 B	
~ 5 ×	່ ພ § ຂ	2 5 €	្តថ្ម	
-E	ა ქ	28	7 7	
٦₹_		္မွမ္လ	25	
728	A \$ 2	* 55 5	I S	
׊	> 5	ځ ن	- Š	
្ជថ្ង	A S	ا في	្និខ្ល	
⊾ F ຂ	_£s	> \f \8	្តិខ្លួ	
> E ~	ᅺᅗ	. 8~	្តិភ្នំ	
9 3	~ E	ខ្លួ	V I I TCATCATCO B40	
~ g °	₩ ţ B	្តថ្មី	J.E.	
្នដ្ឋ×	[™] 55.5	~ § ~	_ 5 2	5
~ B	₽₹	S L	V V I I L TICTICATICATICATI 820 830	ÏĔ.
ے ٍ `	يُ ؤِ يَ	يَّق	ົ §	75
~ 5 ≥	-33	_ 38 %		
- E	¥ \$ _	~ Q''	[]	CCACTEA 910
្ខ ថ្	٧ کا	> E	_ <u> </u>	S P L N V S TCCCACTCATGTTTCA 910
~	G	- 6	- E	- F

平成 7.12.20 発行

(16)上記規成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列に対応するヌクレオチ ド塩基配列を有する、請求の範囲(15)配載の組換え DNA分子。

HETPAVPRV PRPETAVARTOR	L L C W W F A Q W A C A S C T T W T W A A Y W L T U K S T GOTGETGCGCGCGATGACCAGTGACCGATAACAATTGCAAATCAACT 100 110 110 110 110 110 140 150 150 150 150 150 100 100 100 100 10	N P K T I L E U E P K P V B Q V T V Q I S T K S G D U K S ANTITCAACAATITCAACCCAAAOCCCAAOCCCAAOCCCAACCCCAACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCC	K C F Y T T D T E C D L T B E I V K D Y K Q T Y L A R V F S AAATGCTTTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	Y P A C W V E S T G S A C I P L Y E B S P E F T P Y L E T B TACCOCCACACACATTCACACACATCTCACACACACACAC	L C Q P T I Q S P E Q V C I K V W V T V E D E R T L V R R H GTOCHAGOCIACATTERALGETTOCHAGAGAAAAAATCAATTGCACACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA
N E T ATORACACE 40	L L L C W V F A Q V A G A S CTCTGCTCCCCTCCACTTCACCTCCCCCCCCCTTCA 100 110 120 130	N F K T I L E W E P K P W B ANTICAACAANOOCCAAI 190 200 210 220	K C F Y I I D T E C D L I B AANTETTITACACACACACACACTETCACCTCACCACA 290 300 310	Y P A C N V E S T G S A G E TACCOCCACCCATTCTCACACCACTTCTCTCCCCCACA 370 400	L C Q F I I Q S F E Q V C T CTCZARACCANTTACACITTAAACACTOCQAACAC 450 470 489 490

мв		-20 Etavartll	
10 SGTTNTVAAY		30 TILEWEPKPV	
•	:		-
. 50	60	70	. 80
KSGDWKSKCP	YTTDTECOLT	DEIVKDVKQT	YLARVFSYPA
90	100	110	120
GNVESTGEAG	eplyenspep	TPYLETNLGO	PTIQSFEQVG
130	140	150	160
TKVNVTVEDE	RTLVRRHNTP	LSLRDVYGKD	LIYTLYYWKS
170	180	190	200
SSSCKKTAKT	NTNEFLIDVD	XGENYCPSVQ	AVIPSRTVNR
210	220	230	240
KSTDSPVECM	GQEKGEFREI	PYIIGAVVFV	AIIFAIIFŸİ
250	260		
SLHKCRKAGV		NVS	

(17)上記ペクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を指揮しうる、請求の 範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。

(18)上記ペクターが、宿主網路中、上記タンパク賞を発現しうる、請求の範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。

(19)上記ペクターか、宿主細胞中、上配前駆体タンパク質を発現しうる、請求の 税題 (14) 記載の組換えDNA分子。

2 8 330 ANGICIACACICIIC G E ∴P L Y E N TCCCACCTCTCTATCACAA 400 410 ACTCA. ន្តន A S G CTTCACGCA V N Q CTCAATCA 220 T D E ACCCACCA 310 9 CAGTTGCCGGCG 1 COUT ATCTCCACCAC TOCACT 200 TTCACA 290 7 200 K C F Y .T AMATOCITITACACAA 280 CACCOU 8

(21)わずか 5 0 アミノ散残差を含み、かつ、

-VNQVYTVQIST-, 及び

-LYYWXSSSSGKXT -

からなる群から選ばれた式で表わされる配列に対応するアミノ放鉄基を含む、 ヒト組織因子結合部位ペプチド級似物。

(22)上記ポリペプチドが、式:

H-YNGVYTVQIST-OH

で去われる、請求の範囲 (21) 記載のポリペプチド類似物。

(23)上記ポリペプチドが、式:

H-LYYWKSSSSGKKT-OH

で表われる、請求の範囲(21)紀載のポリペプチド類似物。

(24) H-BPKPYNQYYTYQISTKSGD#KSKC-OH.

H-VPGKDLIYTLYYWKSSSSGKKT-DH 、及び

 ${\tt H-SSGKKTAKTNTNBFLIDVDKGENYCFSV-DR.}$

からなる群から選ばれた式で扱わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド級 似物。

(25)

H-SGTTNTVAAYNLTWXSTNFKTILEWEPKPV-OH, H-TKSGDMXSKC-OH, H-ESGDMXSKC-OH, H-ECDLTDEIVKDVXQTY-OH, H-LARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFFPYLC-OH, H-YENSPEFTPYLETNLGQFTLQSFLQVGTKV-OH, RU H-QAVIPSRTVNRKSTDSFVEC-OH.

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類 似物。

(26)a)ヒト組織因子重鎮タンパク質と免疫反応し、

ь)

H-EPRPVNQVITVQISTKSGDNKSKC-OH,
H-VYRDLITILYYMKSSSGKKT-OH,
H-SSSGKKTAKTHTHEFLIDVDRGENYCFSV-OH,
H-SGITNTVAAYHLIMUSTNFKTILEWEPRPV-OH,
H-TESGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVMDVWQTY-OH,
H-KSCDWKSKC-OH,
H-ECDLETDEIVKDVKQTY-OH,
H-LARVISYPAGNYESTGSAGEPLYENSPETTFYLC-OH,
H-YINSPETTFYLETHLGGPTIQSFEQUGTKY-ON, RU
H-QAVIFRTVNKKSTDSFVEC-OH, RU.

からなる群から選ばれた式で表わされるポリペプチドと免疫反応し、かっ
c) DSPYECH GQEXGEPRE! PYLICA で示されるポリペプチドと実質的に免疫 反応しない、

抗体分子を含む、抗体組成物。

(27)上記抗体がラベルに結合している、論求の範囲(28)記載の組成物。

(28)上記沈体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、請求の範囲 (28) 配載の組成物。

(29)ヒト越級因子重額タンパク質及び配列: BPKPV NQYYTVQIST KSGDWKSKC で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TP8-5G 9と命名されたハイブリドーマ。

(30)請求の範囲 (29) 配軟のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモ ノクローナル抗体組成物。

(31)とト組権因子重領タンパク質及び配列: EPKPV NQVYTVQIST KSCDWKSKC で表わされるポリペプチドと免疫区応する抗体分子を定生する、TF8-10 H10と命名された、ハイブリドーマ。

(32)競求の範囲 (31) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモ ノクローナル抗体組成物。

(33)とト組織因子重鎮タンパク質及び配列: VFGKD LIYTLYYWKS SSSCKKT で表 わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF 9 - 8 B 4 と 命名したハイブリドーマ。

- (34)前攻の範囲(33)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモ ノクローナル抗体組成物。
- (35)a) 身体サンプルを、ヒト組織因子重線タンパク質と混合し、免疫反応混合
 - b) この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織因子と免疫反 応し、免疫反応度物を形成するのに十分な時間維持する、そして、
 - c) ステップb)で生成した免疫反応控制の存在を検定する、
- 以上a)~c)のステップを含む、体液サンブル中のヒト組織因子重順タン パク質の存在を検定する方法。
- (36)a) 請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージを含むサンプ ル中に存在するとト組織因子遺鏡タンパク質の存在を検定するための、キッ トの形をした診断システム。
- (37)上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、
 - a) TP8-5G8.
 - b) TF9-8B4.
 - c) TF9-10H10

からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生される、休水の範囲(38)紀 並の診断システム。

- (38)*) サンブルを、請求の範囲(15)記載のポリペプチドを固体マトリックスに 固定した固体サポートと混合して、結合反応混合物を形成する、
 - b) 上記結合反応提合物を、凝血因子が上記ポリペプチドと結合し、固相複 合体及び上清を形成するのに十分な時間維持する、
 - c) 上記複合体から上記上積を分離する、及び
 - d) ステップc)の分離した複合体から、上記凝血因子を回収する、
 - 以上、a)~d)のステップを含む、サンブルから血液凝固因子班/Waを 単離する方法。
- (39)実質的に、ヒト組織因子経験タンパク質を含まない生理学的活性のあるヒト 組織因子重額タンパク質の水溶液を含む組成物。
- (40)上記生物学的活性のあるヒト組織因子重線タンパク質を、リン肪質中に分散
- (43)a)少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子経境 タンパク質を含まない、生物学的活性のあるヒト組織因子重線タンパク質の 水溶液を含有する組成物を含むパッケージ、

を含む血管システム液体サンプル中での凝固能を検定するキットの形をした診 断システム。

- (44)上記重瞭タンパク質がリン脂質中に分散している、請求の範囲(43)記載の途 断システム。
- (45)上記タンパク質が可容性であり、かつ、以下のアミノ酸残基配列を有する、 請求の範囲(43)記載の診断システム。

•	10	20	30,	40
SGTTNT	VAÄY	nltwxstnpx	TILEWEPKPV	NOVYTVQIST

60 70 KSGDWKSKCP YTTDTECDLT DEIVKDVKQT YLARVFSYPA

90 100 110 120 GHVESTGSAG EPLYENSPEF TPYLETNLGQ PTIQSPEQVG

130. 140 150 TKVNVTVEDE RTLVRRNNTF LSLRDVFGKD LIYTLYYWKS

180 190 200 SSSGRRTAKT NTNEFLIDVD RGENYCPSVQ AVIPSRTVNR

210 KSTDSPVECM GOEKGEFRE 平成 7.12.20

(41)上紀溶液が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲(39)記載の組成物。 (42)上記タンパク質が可給性であり、がつ、以下のアミノ酸残甚配列を有する、 請求の範囲(39)記載の組成物。

			;
10	20	. 30	40
EGTTNTVAAY	nltwkstnfk	TILEWEPRPV	NQVYTVQIST
,	•		
. 50	60	70	80
KSGDWKSKCF	YTTDTECDLT	DEIAKDAKÕL	YLARVFSYPA
90	100	110	. 120
Gnvestgsag	eplyenspep	TPYLETHLGQ	PTIQSPEQVG
• ;	• • •		•••
130	140	150	. 160
TKVHVTVEDE	RTLVRRNNTP	LSLRDVPGKD	LIYTLYYWKS
170	180	190	200
SSSGKKTAKT	NTNEPLIDVD	RGENYCFSVQ	AVIPSRTVNR
210			
KSTDSPVECH	GQEKGEPRE		
	_	_	

- (46)a)ヒト組織因子重線タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する第1のD NA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結 合する、アミノ敵政基リーダー配列をコードする第2のDNA新片で、政第 1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前駆体をコードする運成標 **造遺伝子を規定しているDNA断片と機能的に結合する、ホ乳類級胎に適合** する発現ペクターを含む組換えDNA分子でトランスホームしたホ乳類細胞 の栄養培地での培養を開始する;
- b)上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、 かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そして c)上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する、
- 以上、a)~c)のステップを含む、成熟ヒト組織因子重領タンパク質の調
- (47)上記漢成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (46)配載の方法。

2 320 PKPVHQVTTVQISTKSC CCCAAACCCTCAATCAGTTCAATTAGCACTAACTCAGGA 210 220 230 240 250 2 G T T N T V A P ACCENTACIANTACTCTCCACC 140 150 3 I D T E G D L T D E) NCACACACACTCTCACCTCACCCACACA 290 300 310 CCCCAC 9 5 Serren 22 N F K T I L E U E
AATTICAACAATTITCCACTCCLA
190 200 ž Y P A C N V TACCCCCACCATCT 370 K C F Y T I 280

(48)請求の範囲(46)記載の方法により産生した、成熟とト組織因子重幀タンパク 質を基本的に含む組成物。

(49)請求の範囲(47)記載の方法により産生した成熟とト組織因子重領タンパク質 を基本的に含む組成物。

(50)ヒト組織因子重領タンパク質及び配列: PKPY NGYTYQIST KSCDWXSXCで扱わ されるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を確生する、TF-9-5B7と 命名されたハイブリドーマ。

(51)請求の範囲(50)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

乔 統 補 正 書 (方式)

平成 7. 3 28 月 日

特許庁長官 聚

I. 事件の表示 昭和 6 3 年特許期第 5 0 3 5 5 5 号 {PCT/US 8 8 / 0 0 9 9 8 }.

2. 名明の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA 版件・ポリペプチド及び抗体

3.雑正をする者

事件との関係 出 職 人

么 ss

スクリップス ノクリニック アンド リサーチ

4.代 珥 人

住 所 東京都千代用区九の内ま丁目3番1号 電話(代)3211-8741

氏名 (5985) 弁理士 中 村

5.補正命令の日付

平成1年8月22日

8.補正の対象

明細音および請求の範囲の解釈文

翌面の解釈文(第3、 9、10、15、12、13、14、16、17図)

7. 前正の内容

別紙のとおり

「明解書、埼永の戦闘および辺而の説訳文(第3、9、10、11 |13、14、16、17団)の浄彦 (内容に変更なし)

カズ (畑)

明 細 春 ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ ポリペプチド及び抗体

(本出頭の関連文献)

本出別は、1987年3月31日に出願された米国出題第 033.047号及び1987年6月25日に出願された出顧第 067.103号の部分雑誌出願である。

(技術分野)

本発明は、ヒトの組織因子重額タンパク質(huTFh)をコードする構造遺伝子を有する組織えDNA分子(rDNA)に関し、より詳細には、本発明は、宿主細胞中に含まれる、huTFhを発現しうる発現ベクターに関するものである。また、本発明はhuTFhの合成ポリペプチド類似物及びhuTFh及び徐ポリペプチド類似物と結合するモノクローナル抗体に関する。

(発明の背景)

凝血は、一群の凝集因子として知られる細胞性及び血性性タンパク質によって仲介される、一速の、酵素、共因子、タンパク質分解及びゲル化反応のカスケードによって起こる。このカスケードの開始は、退機因子(TP)として知られる細胞性レセでプターが、凝集因子で又はその誤事体、因子で』と結合し、触媒的に活性のある複合体を形成したときに起こる。TPの非存在下、及び複合体への連続する結合がない場合には、個/Wak凝集を開始しない。従って、TPの化学的かつ生化学的特性が、凝集のメカニズムを理解する上で重要なことは明白である。

組織因子は、通常循環器中で可容化しておらず、また、因子 W ノ曜 a 及び他の薪集因子を含む血漿タンパク質と接触で含ないこ とが分っている、膜に結合した糖タンパク質である。組織因子は

混合物の界面活性利及びイオン組成に影響されると報告されている。ネマーソン(Maperson). ジャーナル・オブ・クリニカル・インペスチゲーション(J. Clin. Invest.) 4 7 ~ 7 2 頁(1958) t ネマーソン(Menerson). ジャーナル・オブ・クリニカル・インペスチゲーション(J. Clin. Invest.) 4 8 ~ 3 2 2 頁(1969 年)及びカーソン(Cerson) 等、サイエンス(Science) 、 2 0 8 毫、3 0 7 頁(1980年) 参照。

単離した、もしくは、再習質化したTF合有タンパク質調製物は、数キの種の組織から抽出物によって調製した。組織因子は、 天然の組織中に非常に少量しか存在しないので、歴史的に使用されてきた方法は、困難で、時間もかかり、かつ低収率であった。 古典的方法のレヴューとしては、ネマーソン(& seneracon) 等の 報告(プログレス・イン・ヘマトシス・アンド・トロンボシス (Prog. Hem. Thron.) 6巻、237~261頁(1982年) を参照せよ。

最近、プローズ(Broze)等(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Blot. Ches.)250巻、10917~20(1985年)) ボム(Bose)等(トロンボ・リサーチ(Throad. Res.)42巻、635~643頁(1986年)及びグハ(Guda)等(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Hall. Acad. Sci.)USA83巻、299~302頁(1985年))は、股間質化組満因子タンパク質を、非イオン性昇回活性利及びCaCacを含む水溶性溶液に溶かした時、額タンパク質が因子と2/42と結合するという発見に基づいた方法を用いて、ヒトの組織因子(huTF)タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離する手段として、因子リンパ質和性吸養体を用いる。これ

選常、血管を形成している細胞の表面上には発現されていないが、 血管中の単類によるその発現は、パクテリアのリポ多域のような 感染性は乳成分、ある抗原により刺激されたTへルパー細胞由来のリン ホカイン及び免疫疫苗体によって誘導することができる。例えば パクテリアのリポ多種同様、インターロイキン1及び健康境死因 子アルファのような単細胞/マクロファージのある炎症仲介物は 血球の体検側表面にTPを発現する内皮細胞を刺激することができる。 典型的に、血管要素におけるTFの発現は、拡大する血管 内級血又は、局部的な凝血の開始、すなわち血栓形成を起こす。

組織因子は、試験管内の総裁界細胞を含む培養物中のある血管 外組設、未同定型の脳細胞及び基底膜バリヤーにより、循環する 血器タンパク質から分離されている上皮細胞の姿質上に構成的に 発現される。これら細胞上のTPの存在は、組織損傷の結果とし ての血液との接触でクロットを形成する。従って、TFは、凝血 システムが開始する基礎である。

ハウゥェル(Bowell)(アノリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー(Am. J. Physiol.)31巻1買(1912年))の報告は、TPを含む単離した組織タンパク質(理製物は、リン設質ータンパク質(リボタンパク質)複合体として存在するときのみ凝集を促進することができることを示す最初の報告である。與質と会に、TP含有組織タンパク質の早期が、適常TPタンパク質を再脂質化することによるTPの機能的プロコアグラント活性の再構成が必要であることから、これら再構成の研究が多くのは、リン脂質のタイプ、タンパク質に対するリン脂質の比、及び再構成のタイプ、タンパク質に対するリン脂質の比、及び再構成

ら方法の使用は、有意量の単離11/14。を入手することの困解性 のみならず、因子11/14。の不安定性によっても期限される。

プローズ等(上記)は、huTFに特異的なモノクローナル拡 体の開発及び免疫現和性吸着体としてのそれらの使用は、因子を ノVia使用の制限によって起こる問題を回避できることを指差し ている。しかし、抗ーhuTFモノクローナル抗体は、放文献中 には報告されていない。さらに、子牛のTFによって生じる2つ のモノクローナル抗体(カーソン(Carsoa)等、ブラッド(Blood)。 662巻156頁(1985年))は、huTFとは免疫反応を 起こさない(グハ(Guha)等、上記)。

(本発明の概要)

1 つの感機において、本発明は、ヒトの組機因子重額(hoTFh) タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わず か約12.000塩基対を含むDNA断片を考案している。複構造 遺伝子が、第1回の約1番から約263番で示されているアミノ 放照基を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さ 6に、抜構造遺伝子は、第2回の約130番から、約918番で 示されるヌクレオチド塩基配列を有することが好ましい。

望ましい熊様においては、そのDNA低片は、第1の配列の5、末端と連続し、かつ、huTPhタンパク質のアミノ末端に結合したアミノ酸残器リーダー配列をコードする第2の配列をも含む。その第1及び第2のDNA配列は一緒になって、ヒトの組織因子童鎮前駆体(プレトuTFh)タンパク質をコードする。核流成構造遺伝子は第1回の約~32番から約263番で示されるアミノ酸残器を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、協流成構造遺伝子は、第2回の約34番から約918番のヌクレオチド塩菱配列を

有することが望ましい。

別の転換において、本発明は、ヒトの組織因子重額タンパク質をコードする1つの構造遺伝子を定義する第1のDNA断片と複能的に結合したベクターを含む超換えDNA分子を考案している。さらに該超換えDNA分子は、第1の断片の5 * 末端に連続し、上記タンパク質に結合するアミノ散残差リーダー配列をコードする第2のDNA断片を含むことが好ましい。すなわち、上記の第1及び第2のDNA断片は一緒になって、上記タンパク質の前駆体をコードする混成構成遺伝子を定義している。

別の態機において、本処男は、わずか約5gアミノ酸残器を含 み、かつ式

· - VNQVYT-

で表わされる配列に相当するアミノ散残器配列を合むヒトの組織 因子結合部位のポリペプチド類似物を考案している。

さらに好ましくは、本発明はわずか約50アミノ酸残蓄を含み、 かつ、

- VHQVYTVQIST - , AU

- LTYWESSSSKET -

からなる群から選択される式で表わされる配列に相当するアミノ 酸残高を含むと トの組織因子結合部位のポリペプチャ類似物を考 蒸している。

さらに本発明の危機には、

- a)ヒトの組織因子薫鎖タンパク質と免疫反応する、
- b) H-EWEPKPVNQVYT-OH,
 - H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKC-OH,
 - H-VFGXDLIYTLYYHKESSEGKKT-OH,
 - H-ROVFGKDLIYTLYYKK-OH
 - H-IYTLYYWKSSSGKKTAK-OH,
 - H-SSSGXXTAXTHTNEFLIDVDXGENYCFSV-OH,

また、本発明は、

- a) 生理学的に許容される希釈解及び効果的な生体内指示手段と 結合させたハイブリドーマTP9-10H10によって作られ たある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検等 に静脈注射により投与し、血栓中に存在するヒトの組機因子と 免疫反応させる、
- b) 該抗体分子が、血栓の一部として生体内に存在する組織因子 と免疫反応し、かつ、免疫反応物質を形成するのに十分な時間、 その投与を受けた被検令を維持する。
- c) ステップb) で生成した免疫反応生成物の存在を検定する、以上 ») ~ c) のステップを含む、生体内で血栓を検出する方法も考案した。

さらに、本発明は、TP8-5 G9及びTP9-6 B 4 からなる群から選択されるハイブリドーマにより生産され、存在するヒトの組織因子と効率よく結合する、ある量の沈体分子を含む生理学的に許容される希釈剤を含有するモノクローナル沈体組成物を、被検者に静原注射によっと投与することを含む、生体内で、凝集因子 4 / 1/11 × と結合するヒトの組織因子の能力を中和する方法も考定している。

また、本発明は、因子VI/VI』と反応するのに有効な量の、

H-EWEPKPVHQVYT-OH,

H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSXC-OH,

H-VYCKDLIYTLYYWXSSSSCKKT-OH,

H-RDVFGKDLIYTLYYWK-OH

H-IYTLYYWKSSSSGKKTAK-OH, RU

H-SSSCKKTAKTHTHEFLIDVDKGENYCFSV-OH;

からなる群から選ばれるポリペプチドを含む生理学的に許容され

H-SGTTHTVAAYHLTWKSTHFKTILEKEPKPV-OH

H-TESGDWXSKCFYTTDTZCDLTDZIVKDVKQTY-OH,

H-XSGDHKSKC-OH,

H-ECDLTDEIVKDVKQTY-OH,

H-LARVESYPAGINVESTGSAGEPLYENSPETTPYLC-OH,

H-YENSPETTPYLETRILGOPTIQSFEQVGTKV-OH, BUT

H-QAVIPSRTVIRKSTDSPVIC-ON: BU

からなる群から選択される式で表わされるポリペプチドと免疫 反応する、

c.)実質的に第1図の部位204から部位226で示される式で 変わされるポリペプチドとは免疫反応しない、

抗体分子を含む抗体組成物である。

また、本発明は、ハイブリドーマでP8-5G9、TP9-10H10、TP9-5B7及びTP9-6B4と、それらハイブリドーマによって生成される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を考案している。

本発明は、

- a) 身体試料を、ヒトの組織因子重線タンパク質と混合し、免疫 反応混合物を作る、:
- b) その混合物を、抗体が、その試料中に存在するヒトの観機因子と免疫反応し、免疫反応度物を作るのに十分な時間維持する、 21.7
- c) ステップも) で生じた免疫反応 監物の存在を検出する、 以上のステップを含む体液 試料中のヒトの規模因子重線タンパク 質の存在を検定する方法も考案している。

る希釈用を含有するポリペプチド組成物を、静原注射で被検令に 投与することを含む、生体内で、ヒトの組織因子が、凝集因子で /ほっに結合することを望きする方法を考案している。

別の態様において、本発明は、本発明の抗体組成物を含有する パッケージを含む、試料中のヒトの組織因子重質タンパク質の存 在を検定する、キットの形をとった診断システムを考案している。 その抗体組成物は、

- a) TF8-5G9.
- b) TF9-684.
- c) TF9-10H10,
- d) TF9-5B7.

からなるハイブリドーマの母から遺ばれたハイブリドーマにより 生敗されるモノクローナル抗体を含むことが望ましい。

また、試料から血液凝集因子M/Maを早離する方法も考案された。

この方法は、

- a) 固体マトリックスに固定した、請求項15 記載のポリペプチドを含む固体サポートと試料を混合することにより結合反応混合物を作る、
- b) 上記符合反応混合物を、上記数集因子が上記ポリペプチドと 結合し、固体複合体及び上情を作るのに十分な時間、複持する、
- c) 上記復合体から、上記上清を分離する、そして
- d) ステップ c の分離した複合体から、上記凝集因子を回収する、 以上、 a) ~ d) のステップを含む。

さらに、実質的に、ヒトの組織因子軽値タンパク質を含まない、 生物学的に活性のあるヒトの組織因子重質タンパク質の水溶液を 含む組成物を考案した。この生物学的に活性のあるヒトの組織因 子重領タンパク質は、リン賠償又は、非イオン性界面器性剤中に 分散されていることが望ましい。

血管系液体試料中の最無能力を検定するための、キットの影を とった体制システムも考案された。それは、実質的にヒトの組織 因子経債タンパク質を含まない、少なくとも1回の検定を行うの に十分な量の、生物学的に活性のある、ヒトの組織因子重債タン パク質の水溶液組成物を含有するパッケージを含む。その重質タンパク質は、リン脂質中に分散されていることが望ましい。

別の競技において、成熟したヒトの組織因子重額タンパク質の 顕製法及びその方法によるタンパク質発見重数も考案されている。 この方法は、

- a) 栄養物地中、ヒトの組織因子重領タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片及びその第1の断片に連抜し、かつ、上記タンパク質に付随するアミノ酸残蓄リーダー 配列をコードする第2のDNA断片と機能的に結合し、宿主 本 乳質細胞と適合する発現ベクターで、上記第1及び第2のDNA 断片が上記タンパク質の前駆体型をコードする機成構造遺伝子を定義するものであるようなペクターを含む組換えDNA分子でトランスホームした宿主 本乳質細胞の特養を節始する、
- b) その培養物を、上記額随が、上記組換えDNA分子からタン パク質を発現し、かつ、上記成務型のタンパク質を形成するの に十分な時間維持する、そして、
- c) 上記培養物から、上記成熟型のタンパク質を回収する、 以上a)~c) のステップを含む。

図面の顔母な説明

図式は木公開の一部を形成している。

第1回は、1文字アミノ酸残蓄コードを用い、左から右に、ア

トン (k) で示した見かけの分子量をもつ分子量標準物質を示している

第6回は、例4で説明されているようだ、まずhuTF特異的モノクローナル抗体で免疫沈取化し、ついで8~17%のポリアクリルアミド勾配ゲルで電気泳動した、因子収/リョの観和性で 単離したhuTFのオートフルオログラムを示している。レーン Aは、DTTによる遺元を伴う、電気泳動した *** 1ラベル化 huTFを示している。レーンBは、週元なしで電気泳動した同サンプルを示している。

第7回は、15%アクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子 WIVI = の既和性で早難したカロTFのオートフルオログラムを 示している。単離、***!によるラベル化、還元及び及グリコン ミノ末端からカルホボキシ末端の方向で、ヒトの組物の子薗镇タンパク質の成熟型及び前駆体(各々、huTFh及びブレbeffh)の完全なアミノ設践基配列は、1番から263番に対応する。マイナーな成熟型タンパク質の配列は、3番のアミノ放践基配列は、1番から263番に対応する。マイナーな成熟型タンパク質の配列は、3番のアミノ放残基配列は、3番のアミノ放残基配列は、つくが上配列(前駆体領域)に相当するアミノ放残基配列は、マイナス番号で示した。相比外ドメイン及びトランスメンブレン・アンカー領域は各々、部位1~219及び220~242に対応する。第2図は、1文字ヌクレオチド塩器コードを用い、たから7年の対域は、1文字ヌクレオチド塩器コードを用い、たから右に5・末端から3、末端の方向で、プレトロで下h及び外を示している。トロTFhの構造遺伝子は塩蓄130から始まり、塩蓄918で終わる。

その読み枠は、各アミノ酸を示す1文字を、対応するコドンの 中央の塩益上に置くやり方で、ヌクレオチド配列の上に推察され るアミノ酸残益を付置することにより示した。

第3回は、例2で提明されている、huTPの凝血悟性を測定するのに用いる、減量検定を示す回である。同対数プロットは、 ひとミリリットル当りのピコグラムで表わしたとトの組織因子 (huTP) 造度で示される、ヒトのクエン酸化血漿凝集(軽血) 特間を示したものである。

第4回は、10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、 因子などはa観和性で単縁したhuTFhのオートフルオログラムを示している。レーンAは、例4で説明されているように、単 離され、電気泳動的に、ジチオスレイトール(DTT)で還元した***1ラベル化huTFを示している。レーンBは、キロダル

ル化は、例4で説明されているように行った。レーン1は、キロダルトンで扱わされた見かけ上の分子量をもつ複単物質として電気休動したタンパク質復準物質:リゾチーム、14.3 ; カルギニック・アンヒドラーゼ、30.0; オパルブミン、45.0; ウシ直清アルブミン、69.0; ホスポリラーゼも、92.5; ミオシン、200.0(ナベて「し州、アーリントンハイツ・アマーシャム社より入手)を示している。***!ートuTFを含むサンブルをDT丁存在下(レーン2及び3)又は非存在下(レーン4及び5)で電気休動した。これら***!ートuTF合有サンブルのいくつかは電気休動前に放グリコシル化し(レーン3及び3)、他のものは脱グリコシル化しなかった(レーン2及び4)。

レーン 3 及び 5 に放した・・・・ [- h u T F 含有サンブルは、電 気体動前に限ゲリコシル化され、レーン 2 及び 4 のものは酸ゲリ コシル化しなかった。

第8図は、例9で説明されているように、10%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、免疫観和性で早難されたhalfのオートフルオログラムを示してい。レーン1は、キロダルトンで変わされる見かけの分子量をもつ、マーカーとして電気泳動した環境タンパク質:チトクロムC、124:ラクトグロブリン、18.4:カルボニック・アンヒドラーゼ、29.0:ラクテート・デヒドロゲナーゼ、36.0:オバルブミン、43.0:グルクメート・デヒドロゲナーゼ、55.0:及びホスポリラーゼト、95.5(全て、MA州ニュートンセンターのディパーシファィド・パィオテク(Diversifled Biotack)から入手した)を含んでいる。

レーン 2 は、スミス(Smjth) 等のBCAタンパク質検定法 (アナリティカル・ペイオケミストリー(Anal. biochem.)150 巻、76~85頁(i985年)) を用いて測定し、かつDTT

平成 7.12.20 発行

を用いて還元した約20 μ g のタンパク愛を含んでいる。 h u T F 重領 (h u T F h) は、明らかに、およそ47 M r の位置に確認 され、h u T F 軽額は、およそ125 M r の位置にわずかに確認 された。タンパク愛は、レムリ(Lacanli)(ネイチャー(Mature)、 227巻、680~685頁(1870))の報告に従がい、コ マージ・ブルー染色により可復化した。

第9回は、huTFhの非リン融質化(非脂質化)ポリペプチド類似物による、huTF由来の凝集開始阻害の投与一応害曲線を示すグラフである。 積々の温度の非脂質化ポリペプチドによる凝集阻害率は、例12に説明されているように測定した。テストしたポリペプチドは、p26-49(Δ TF26.49)、p121-155(O、TF121、155)、p146-167(Φ 、TF146、167)及びp204-226(糖、TP204、226)である。

第10図は、トップドトのリン暦堂化した(勝堂化した)ポリベプチド類似物による、トップド由来の高無開始阻害に関する投与・応告曲線を示すグラフである。その風客平は例9で説明されているように、両方法により、両類似物に対して規定した。

第11図は、組換えDNAプラスミドゥCTF64、ゥCTF314及びゥCTF403内のEcoRI断片挿入物の制題地図を示したものである。その挿入物(——1)は、プレトuTP1選伝子の完全なダクレオチド配列に対応する重複するヌクレオチド配列領域を示している。別に、その挿入物は、第2図で示されている、残器1~486(pCTF64に含まれている)、及び残器135~775(pCTF403に含まれている)、及び残器776~1125(pCTF403に含まれている)由来のヌクレオチドに対応するヌクレオチド配列を、左から右に5・から

例19に述べられているように測定した。白丸(O)はTP8-5G9抗体を示し、馬丸(Φ)は無関係の抗体を示している。

第16図は、抗TFモノクローナル抗体TF8-5GBによる特製したヒトの届TFの凝血活性の関連を示している。リン腺質ベンクル中に再構成された、特製したヒトの届TFの凝血活性は、核トの適度の精製1aGと、37℃30分間、前処理した後側定した。丸は、抗TF抗体TF8-5G9に対するもので、三角は、無関係なコントロール抗体TFA b 100に対するものである。データは、抗体を加えない場合の活性に対する阻害率として表わされている。

第17図は、特製した抗丁ドモノクローナル抗体で処理した、 培養されたJ82勝繋がん粕的に対する阻害因子はの結合及び、 その組数による因子×1の形成を示している。因子×1の形成率 の阻害の値は、三角で表わされ、因子を切る合阻害の値は、丸で 表わされている。データは、抗体を加えないでインキュベートし た細胞を用いて得られる値に対する阻害率で表現されている。パ ネル人は抗体丁F9-2C4の効果、パネルBは、抗体丁F9-587の効果を示している。

現18図は、例25で述べられているような、免疫観和性で単
難した h u T P のウェスタンプロット分析を示している。15%
ポリアクリルアミドゲルに次に示すものがかけられた。レーン1
は、キログルトン(k)でバネル人の左に示された見かけの分子
量をもつ分子量環埠が含まれる。レーン2は、電気水動前に選元
された、精製ヒトヘモグロビン1μ8を含んでいる。レーン3は、単離したhu T P を電気水動前に還元したもの0.5μ8を含んでいる。レーン4は、非還元の、単離されたhu T P 0.5μ8を含んでいる。SDS-P A G B 後、生じたタンパク質パンドを電気

3 ・の方向で含んでいる。また、例 1 6 で述べられている機 * の 組換えDNA分子を構築するのに用いられた神人物内の制限酵素 切断部位のおよその位置も示されている。さらに、完全な形で示 されるリーグーペプチド (ごご) 及びトランスメンブレン・ア ンカードメイン (②) をもつプレカ u T P h タンパク質のお よその位置も示してある。

第12図は、トu T F トの非リン 間質化(非脂質化)ポリペプチド銀収物による、トu T F 由来の凝集関始の阻害を示す、役与一応答曲級のグラフである。モル環度で表わした様々の濃度の非脂質化ポリペプチドによる凝集の阻害率(%)は、例12に述べられているように測定した。 試験したポリペプチドは、p24-35 (Δ)、p26-49 (\Box)、p152-159 (\Box) 及びペプチドp40~71、p72~104、p94~123及びp161189であるがこれらは全て、実質的な阻害を示さず、集物的に異丸(\oplus)で示した。

第13図は、TP8-509旅体組成物による最集限等の速度 給を示すグラフである。凝集の図書率(X)は、例18で述べら れているように測定された種々の抗体免疫反応時間にわたってア ロットしてある。

第14回は、huTF由来の磁体の抗huTF放体による阻害の投与一応答を示すグラフである。積々の慢度の抗huTFモノクローナル抗体TF8-5G9による凝集の阻害率(光)は例19に述べられているように測定した。

第15 図は、huTF運がヒトの機能券組数系列GM1381の細数玻璃物である、huTF由来の凝集の、抗huTF抗体による阻害の投与一応答のグラフである。種々の濃度の抗huTFモノクローナル抗体TF8-5G9による凝集の摂害率(%)は、

泳動的にニトロセルロースに移した。このようにして作ったウエスタン・ブロットを 0.2μ g /m g の 既和性精製したウサギ抗 h μ T F -1 g G (パネルA)、 1μ g /m g の p サギ抗へモグロビン 1 g G (パネルB) 又は、 1μ g /m g の p 先後ウサギ 1 g G (パネルC) と免疫反応させた。免疫染色したパンドの見かけの分子量を右に k D a で示した。

発明の詳細な説明

A. 定核

アミノ政;ここで同定される全てのアミノ政は、天然のレー型のものである。 標準的ポリペプチド命名法に従がい (ジャーナル・オブ・パイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chen.)、243 巻、3557~59頁(1969))、アミノ放残落の時号は、次の照会表に示されているとおりである。

対 応 表

58	号	アミノ政
1文字	3 文字	•
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
A	Ala	アラニン
s	Ser	セリン
L	f 1 v	イソロイシン
L	Leu	. 0122
т	Thr	ネレオニン
· v	Val	パリン
P	Pro	アウリン

ここでは、全てのアミノ酸配列は、従来どおり左から右に、アミノ酸末端からカルボキシ末端への方向で示されていることに住意を要する。さらに、アミノ酸残器配列の始め又は終りのダッシュは、各々、アミノ及びカルボキシ末端のH及びOH(水素及び水酸基)のようなラジカルへの結合、もしくは、ポリペプチド頃における1から約15残器の1つ以上のアミノ酸残器配列を示している。

ポリペプチド及びペプチド;ポリペプチド及びペプチドはここでは、鎮合う残蓄のアルファアミノ蓄とカルポキシル蓋の関のペプチド結合により互いに直鎮的に結合した、わずか約50アミノ設残器を意味するものとして互換的に用いられている。

タンパク質:タンパク質は、ポリペプチドのように互いに直収 的に結合した50以上のアミノ改装器を意味して用いられている。

スクレオチド: 總部分 (ペントース)、リン酸及び窒素へテロ 環塩基からなるDNA又はRNAの単量体ユニット。この塩基は グリコンド炭素 (ペントースの1 ′ 炭素) を介して提部分と結合 しており、塩器と裾の組合せはヌクレオシドと呼ばれる。ヌクレ オシドがペントースの3 ′ 又は5 ′ 部位に結合するリン酸基を含

パク質をコードする構造遺伝子を形成するDNA配列がDNA断 片中に含まれることが望ましい。その遺伝子はhuTFh又はプレhuTFhタンパク質中にあるアミノ酸残益をコードする各コ ドンが中断することなく連続して存在する、すなわち、イントロ ンを含まない遺伝子であることが好ましい。

使って、第2図に示される、5/末端の約130省から、3/末端の約918署の部位の配列を基本的に含み、かつ、huTPb を発現することができるDNA断片が本発明の1態線を構成している。第2図に示される、約34番から約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、プレhuTPhを発現できるDNA断片が、本発明のもう1つの触機を構成している。

好ましい、可容性のカuTPト分子は、カuTPトをコードするDNAの5、末端の約150塩基によってコードされるアミノ 放残基を欠いている。従って、第2回で示される、5、末端の約130番から約756番を極由して、3、末端の約801番の部位までの配列を基本的に含み、かつ、可溶性のカuTFトを発現できるDNA断片は、本発明のさらに好らしい超機を構成する。可溶性のカuTFト溝速遺伝子を形成する、典型的な好ましいDNA断片は、第2回で示されている、約130番から約756番約130番から約801番で表わされるヌクレオチド配列を有するものである。

可溶性プレトuTFトをコードする、好ましいDNA断片は、 それらが、第1図で示されるように、 - 32番から0番までのア ミノ酸残害で示されるような、アミノ未端リーダー配列を含むタ ンパク質をコードしていること以外は、可溶性トuTFトをコー ドしているものと同じである。従って、可溶性プレートuTFト 平成 7.12.20 発行

塩基対(bg);二本額DNA分子内でのアデニン(A)とチミン(T)又はシトシン(C)とグフニン(G)の組合せ。

B. DNA斯片

生物において、タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列は 遺伝子コードを介して、そのタンパク質をコードする構造退佐子 のデオキシリポ核酸 (DNA) 配列に直接関係づけられる。姓っ て、構造遺伝子は、それがコードするタンパク質又はポリペプチ ドのアミノ酸残器配列で定義することも可能である。

重要でかつよく知られた遺伝子コートの性質にリダンダンシーがある。すなわち、タンパク質を作るのに用いられるほとんどのアミノ酸に対し、1つ以上のコードするヌクレオチド・トリプレット (コドン) が、1つのアミノ酸残器をコード又は指定している。それ故、1つのアミノ酸残器をコードするのに多くの異なるヌクレオチド配列が存在することになる。そのようなヌクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ酸残器配列を生産することが可能なので、機能的には等値であると考えられている。場合によっては、ブリン又はビリミジンのメチル化物がヌクレオチド配列の中に超込まれている事もある。しかし、そのようなメチル化は、コード関係にはなんら影響しない。

本発明のDNA断片は、ヒトの組織因子重複タンパク質(hulfh)をコードするDNA配列を含むという特徴をもつ。好ましい越機において、このDNA断片は、ヒトの組織因子重質削弱体タンパク質(プレカuTPh)をコードするDNA配列を含んでいる。すなわち、本発明のDNA断片は、カuTPh、また、より好ましくは、プレーカuTPhの構造遺伝子の存在で特徴づけられる。さらに、可存性のhuTPh又は可容性のプレーカuTPhタン

をコードする構造遺伝子を形成している、好ましいDNA断片は、 あ本的に、第2回で示されている5、来頃の約34番から756 香を経由して、3、来頃の約801番で示される配列を含んでい る。典型的な好ましい可溶性のプレトロTFトコードのDNA断 片とは、第2回で示されているところの、約34番から約756 番、約34番から約771番、約34番から約786番及び約 34番から約801番のスクレオチド塩基配列を有するものであ る。

可得型も含めて、上記トuTFA及びアレトuTPAタンパク 質をコードする相関的DNA及びRNAも先に組拾したように考 落された。

トuTFト及びプレトuTFトをコードするDNA断片は化学的技術、例えばマテウシ(Hatteucci) 等のホスホトリエステル法 (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.) 103巻3185頁(1981年))により容易に合成で含る。(ここで引用されている技術の公開に参考として超込まれている。)もちろん、コード配列を化学的に合成することにより本来のアミノ放残器配列をコードする代りに通当な塩基を用いることにより、いかなる修正も望みどおりにすることができる。しかし第2図に示されているものと全く相同的な配列を含むDNA分子の方が望ましい。

さらに、基本的に h u T F 及びプレ h u T F h タンパク質をコードする構造遺伝子を含む D N A 断片は、これらの遺伝子を含む 組換人 D N A 分子から得ることができる。例えば、プラスミ F タイプの組換え D N A 分子 p C T F 6 4、 p C T F 3 1 4 及びpCIF 4 0 3 はいずれら h u T F h 及びプレ h u T F h タンパク質の異なる領域をコードする D N A 配列を含んでおり、また、これらを 合せると、各タンパク質を発現するのに必要な全てのDNA配列を有することになる。各々、pCTP64、pCTF314又はpCTF403でトランスホームした大鍋園の培養物は、1987年3月27日、ブダペスト協定に基づき、MD州、ロックビル、パークローン、ドライブ12301番、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に保管され、各々、受理番号67370、87368及び67369が割当てられた。

huTFh又はプレhuTFhをコードするDNA配列を含むDNA断片は、よく知られている方法を用い、先に述べた各プラスミドからの適当な制限断片を機能的に結合することにより作ることができる。典型的に、本方法で作られた本発明のDNA分子は、枯着末端、すなわちこの分子の二本領領域を越えて伸びたでき出した。一本領領域をもっている。本発明のDNA分子上に枯着末端があることは望ましいことである。

本発明は、上述のDNA断片と等価なり求検酸(RNA)も考定している。

C, 组换之DNA分子

本発明の組換えDNA分子は、本発明のDNA断片をベクターに機能的に結合することにより作ることができる。

ここで用いられているように、"ベクター"という言葉は、お 物中で自己複製できるDNA分子で、別のDNA断片を機能的に 結合することができ、その結合した断片の複製をもたらすものを 意味する。huTFh及びプレhuTFh遺伝子の発現を可るこ とができるベクターは、ここでは"発現ベクター"と呼ばれる。 従って、組換えDNA分子(r DNA)とは、天然においては通 市一緒にいることはない少なぐとも2つのヌクレオチド配列を合 なハイブリッFDNA分子のことである。

パイオラド・ラボラトリーズ社) 及びpPL、pKK223(NJ 州、ビスカタウェイ、ファルマシア社) がある。

真体用胞、好ましくは脊椎生物和胞と適合する発現ベクターも、本発明の組織えDNA分子を作るのに用いられる。真核和胞発現ベクターもこの分野でよく知られており、数社から市販されている。典型的にはこれらのベクターは、目的とするDNA断片の挿入に便利な制限部位を含んでいる。これらのベクターの典型的なものには、PSUL及びPKSV-10(ファルマシア社)、PBPV-1/PML2d(インターナショナルバイオテクノロジー社)及びPTDT1(ATCC、#31255)がある。

好をしい態様において、本発明の組換えDNA分子を構築するのに用いられる真核性相酌発現ベクターは、真核性細胞中で効果的な選択マーカー、好ましくは、凝剤耐性選択マーカーを含んでいる。好ましい親剤耐性マーカーとは発現によりネオマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo) 遺伝子である。サウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. Nol. Appl. Genet.)1巻、327~341頁(1982年)。

本発明のrDNAを作るための、レトロウイルス発現ベクターの使用も考案されている。ここで用いられているように、*レトロウイルス発現ベクター*とは;レトロウイルスゲノムのロング・ターミナル・リピート(LTR)領域由来のプロモーター配列を含むDNA分子を意味する。

好ましい怠慢において、真型的な発現ベクターは、真核細胞中では寝嬰不能なレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルスの構築と使用法は、ソージ(Sorge)等により報告されてい

本発明のDNA断片を機能的に結合させるベクターの選択は、この分野ではよく知られているように、例えば、タンパク質の発現などの機能的性質及びトランスホームされる宿主相能などが超換え DNA分子の構築技術の上で本質的な制限となることから、これらに直接依存する。しかし、本発明によって考案されたベクターは、これに機能的に結合しているDNA断片中に含まれるトuTPh又はプレトuTPh遺伝子の、少なくとも複製を、好会しくは発現をも可能にする。

好ましい結構において、本発明により考案されたベクターは、原は性のレブリコン、すなわち、バクチリア宿主相触のような原 核細胞中の、これをトランスホームした染色体外組換えDNA分 子の自己複製及び維持を可能とするDNA配列を含んでいる。こ のようなレブリコンは、この分野ではよく知られている。さらに、 原核性レブリコンを含むこれら超様は、これをトランスホームし たバクテリア宿主に棄剤耐性を与える遺伝子も含んでいる、典型 的なバクテリアの取剤耐性遺伝子は、アンピンリン又はテトラサ イクリンに対する耐性を与えるものである。

原核性レブリコンモ含む、これらのベクターは、これをトランスホームした大陽階のようなバクテリア在主細胞中で、heffh National であることができる原核性プロモーターも含んでいる。プロモーターとは、RNAポリメラーゼの結合を許し、転写を開始させる、DNA配列でで含た発現コントロール要素である。バクテリア宿主と適合するプロモーター配列の典型的なものは、未発明のDNA斯片の挿入に便利な制限部位を含むプラスミドベクター中に存在する。このようなベクタープラスミドの典型的なものには、pUC8、pUC9、pBR322 (CA州、リッチモンド、

る(モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロジー(Sci. Cell. Biol.) 4巻、1730~37頁(1984年)。

相続的なホモポリマー末端を介して、DNAモベクターに限能的に結合する多くの方法が関発されてきている。例えば、相補的なホモポリマーを、押入するDNA断片及びベクターDNAに付加することができる。それから、このベクターとDNA断片を相様的ホモポリマー末端間の水素箱合で結合し、組換えDNA分子を作る。

1つ以上の制限部位を含む合成リンカーは、DNA断片をベクターに結合するもう1つの方法を提供する。先に報告されて成したうに、エンドヌクレアーゼで制限液化することによせて交出なる。たり、A断片を、3°、となったで制限液化で、Vに活性で突出なる。ない、一本線末端を除き、また重合活性で、NAボーンのはない、では、大脳関のNAボリメラーゼーで、型理する。それからでのようなでは、大路域を大力を発展して、Vの組合せて、平滑末端DNAが出する。それからのような、平滑末端DNAが上ずる。それからのような、平滑末端DNAがデーションを触媒することができる。では、平滑でで、大路側のリンカーションを触媒することができる。では、下でで、大路側のリンカーをもないできる。では、で、大路にこのDNA断片を選合するで、対応に、2000にこのDNA断片を選合するで、サイケーションする。

多種の制限エンドスクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、 CN州ニューヘブン、インターナショナル パイオテクノロジー 社を含む多くの会社から市販されている。

本発明は、上述の組換え·DNA分子と等価なRNAも考案して

いる。

D. トランスホームした初跑と培養

本発明は、本発明の組換えDNA分子、好定しくは可溶性のhuTFhを見びできるェDNAでトランスホームした宿主細胞にも関連している。この宿主細胞は、原核性でも真核性でもよい。パクテリア細胞は、原核宿主細胞であることが好なしく、また典型的には、ND州ペセスダ、ペセスダ・リサーチラボラトリース社から入手できる大場歯のHS様のような・サルスはヒトの機様芽細胞が含まれる。好ましい真核性溶主細胞には、イースト及び水乳類和胞が含まれる。好ましい真核性溶主細胞には、CCL61としてATCCから入手できるチャイニース・ハムスターの卵巣(CHO)細及びCRL1658と、ATCCから入手できるNIHスイスをある。

本発明の組換えDNAによる適当な細胞宿主のトランスホーメーションは、臭型的には用いるベクターのタイプに応じて、よく知られている方法により行なわれる。例えば、原族性宿主細胞のトランスホーメーショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Mati. Acad. Sci.) USA、69巻、2110頁(1972年);及びマニアチス(Haniatis)等のNY州コールド・スプリング・ハーパー・コールド・スプリングハーパー・ラボラトリー、ラボラトリー・マニュアル、モレキュラー・クローニングを参照せよ。脊椎動物細胞の「DNAを含むレトロウイルス・ベクターによるトランスホーメーションに関しては、例えば、ソーツ(Sorge)等、モレキュラー・アンド・セルラー・パイオロジー(Hol. Cali. Biol.) 4巻、1730~37頁(1984

プレトロTFト抗原性を示すタンパク質、またさらに好ましくは、 生物学的に活性なトロTFトを含むことが望ましい。

トランスホームした宿主細胞を培養するのに有用な栄養培地は 当分野ではよく知られており、また、いくつかの販売会社より市 版されている。宿主細胞が水乳頭細胞であるような臆様において は、「無血清」培地を使うことが望ましい。

E、huTFh及びプレhuTFhタンパク質の生産方法

本発明の別の特徴には、 h u T P h 抗原性を示すタンパク質の生産方法がある。 h u T F h 抗原性を示すタンパク質は天然の組織因子によって誘導される抗体を免疫反応を起こすタンパク質である。 h u T P h 抗原性を示すタンパク質は、抗原として有用であり、又、抗体を生じさせるときにも有用で、その各々が本発明の診断システムや診断法で使用することができる。

年)、グラハム(Graham)等、ウィロロジー(Virol.). 5 2 色、6 5 6 頁 (1973年);及びウィグラー(Wigler)等、プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Matl. Acad. Sci.) USA、76 色、1373~76 頁 (1979年)をお殴せよ。

うまくトランスホームされた細胞、すなわち、本発明の退換え DNA分子を含む細胞は、従来の方法によって関定することがで まる。例えば、本発明の「DNAの導入から生じた細胞をクローン化し、モノクローナルコロニーを作る。これらのコロニーから 細胞を収穫し、溶解し、そのDNA内容物について、サウザーン (Southern)(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Hol. Biol.) 98巻、503頁(1975年)又は、ベレント(Borent)等(バイオテクノロジー(Biotech.) 3巻、208 頁(1985年)によって報告されている方法を用いて、その 「DNAの存在を輝ベ大。

TDNA存在の直接的検定に加え、成功したトランスホーメーションは、そのIDNAがAuTFA又はプレAuTFAを発現することができるときは、従来の免疫学的方法で確かめることができる。例えば、発現ベクターでうまくトランスホーメーションできた細胞は、AuTFA又はプレAuTFA抗原性を示すタンパク質を生産する。トランスホームさせた細胞状料を収穫し、本発明のハイブリドーマによって生産される抗原等に特異的な抗体を用い、AuTFA又はプレAuTFAを検定する。

このように、トランスホームした存主報胞それ自体に加え、本発明は、栄養培地中のそれらの細胞の培養物好をしくは、モメクローナル (クローン的に均一な) 培養物、又は、モノクローナル培養物由来の培養物は今日に、この培養物は、 hu TF h 又は

バク質が生じる。

培養物から、発現したタンパク質を回収する方法は、当分野ではよく知られたことであり、従来の生化学的方法を用い、その培養物のタンパク質含有函分の分画が含まれる。例えば、タンパク質の分画に対して知られているゲル認過法、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー及びそれに観するものが、培養物中にある発現タンパク質の単輝に用いることができる。さらに、免疫観和性、免疫吸着やそれに関するもののような、免疫化学的方法も、従来法を用いて行なわれる。

P. huTFh及びプレトuTFhクンパク質組成物と発現度物本発明は、また本発明のrDNAのhuTPh及びプレhuTFhクンパク質発現度物も考案している。好ましい超機において、huTFh及びプレトuTPh発現度物は第1図で示されているように、各々残益1から263及び-32から263に対応するアミノ酸残益を有している。その発現タンパク質は、第1図で示されるプレトuTFh及びhuTFhのアミノ酸残益配列の長さの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%であることが留ましい。

別の脂様において、可容型のカロTFト及びプレカロTFトと、可容性カロTFトをして、または可溶性プレカロTFトを含む組成物も考案されている。ここで用いている。可容性。という言葉は、本来のカロTPト及びプレカロTFト分子の粗胞外ドメイン、すなわち、第1図に示すところのTミノ来増から残器220まで、の、カロTPト及びプレカロTFト分子環域を基本的に含むことを特徴とするカロTFト及びプレカロTFト分子を意味する。それゆえ、可容性カロTFト及び可溶性プレカロTPトは、本来の分子で形成されるトランスメンブレン・アンカー領域の変質的部

分(第1図で示すところの残落220から242)を含まない。 ここで用いている。huTPh。及び、プレhuTPh。という 言葉は今後特にことわらないかぎり、そのタンパク質の可容型を 含んでいる。

可将性のhuTPh及び可溶性ケレhuTPhは、確水的なトランスメンプレン・アンカー領域を含んでいないので、これらは、生理学的に許容される水溶液中で実質的に凝集することはない。それゆえ、可得性のhuTPh及び可溶性のプレhuTPhは、存在するhuTPh又はプレhuTPhタンパク質の少なくとも約70%、好ましくは約80%、そしてより好ましくは約90%(重量パーセント)が非蘇紫(単量体)型であり、タンパク質濃度約0.1.ps/msから約100ns/msの生理学的に許容された粉釈剤を用いた水溶液を作りうることを特徴とする。タンパク質溶液中に存在する凝集量の測定法は、当分野ではよく知られているところであり、排除カラムクロマトグラフィーによるサイズ分質を含んでいる。

好ましい可得性トロTPトタンパク質は第1回で示されているところの、アミノ末端の残益約1番から、209番を経由してカルボキシ末端の残益224番で示されるアミノ放残器を示している。従って、好ましい可能性トロTPトタンパク質は第1回で示すところの約1番から約209番、約1番から約219番及び約1番から約224番の残器で表わされるアミノ改残器配列を有するものである。

好ましい可溶性プレトロTFトタンパク質は、第1図で示すと ころの、アミノ末崎の~32番から、209番を径由して、カル ボキシ末端の224番の残器で表わされるアミノ酸残器を有して いる。従って、好ましい可溶性プレトロTFトタンパク質は、第

下、血管系液状サンプルを凝集する能力を意味する。磁楽能力を 検定するのに十分な、典型的 h u T F h タンパク質濃度は、例 2 におけるサンプルノ h u T F h 比と同じ比を用いたとき、的 0.1 p g / a g から約 1 0 0 n g / a g、好ましくは、約 1 p g / a g から約 1 0 p g / a g から約 1 n g / a g をしてより好ましくは約 1 0 p g / a g から約 1 n g / a g である。もちろん、磁集能力を検定するときに 必要な濃度よりも高い濃度であるが、好ましい温度に分取しうる h u T F h 溶液も考慮されている。

好ましい態様において、huTFh含有水溶液は、リン脂質又は非イオン性昇面活性剤中に分散されたhuTFhを含んでいる。 典型的リン脂質:huTFhタンパク質重量比は、約5:1から 12000:1、好ましくは、約50:1から約5000:1そ してさらに好ましくは、約100:1から2500:1の範囲で ある。

C. ポリペプチド

本発明の各ポリペプチドは、せいぜい約50個、より通常には 約35個以下の、そして好ましくは約25個以下のアミノ設残器 を含んでおり、かつ、少なくとも10個の残器を含んでいる。さ らに、本発明のポリペプチドは、そのアミノ改残器配列及び新し い碗能特性を特徴としている。

従って、本発明のポリペプチドの1つの駐機は、直波軽無因子 W/VIaへのトロアドトの結合を競合的に阻害する能力をその特 徴の1部としている、トロアドト結合部位ポリペプチド類似物で ある。本発明の結合部位類似物は活性化した複合体を作ることな く、すなわち、砂無を開始することなく因子VI/VIaに結合する ことが望ましい。

ここで用いている。複合体。という言葉は、抗原-抗体又は、

平成 7.12.20 発行

1 図で示すところの的 - 3 2 香から 2 1 4 香、約 - 3 2 香から 2 1 9 香、及び約 - 3 2 香から約 2 2 4 香の残器で変わされるアミノ放残器配列を有するものである。

1 つの起棟において、huTFh及びプレhuTFL発度物は グリコシル化されていない。すなわち、それらは、本発明のrDNA でトランスホームした原核細胞中で生産される。

非グリコシル化型のhuTPh及びプレhuTFhは、本発明 の接種物及び診断システムにおける免疫原及び抗原として有用で ある。

典型的には、実核細胞で生度された h u T P h 及びプレhuffh はグリコシル化されており、また抗原性及び免疫原性に加えて、生物学的活性を有する。ここで用いられているように、"生物学的活性"という語句は、因子VI / VI a の依存の凝集を誘導する能力をもつh u T F h 及はプレh u T P h タンパク質又はポリペプチドを指して使われる。

このように、本発明は、実質的にヒトの組織因子軽額タンパク質を含まない生物学的に活性な A u T P A を含有する水溶液を含む組成物を考案している。その組成物も実質的に例えばラウリル破破ナトリウム等のイオン性界面活性剤、ポリアクリルアミド及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で測定される約、15000ダルトン以下の見かけの分子量を有する組織由来のタンパク質のような物質を含まないことが宴ましい。

水得性のhuTFh含有溶液は血液又はクエン酸化した血質のような血液由来の虚物のような血管系液状サンプルの凝集能力を検定するのに十分な生物学的に活性のあるhuTFhを含んでいる。 な無疑的プレいう語句は生物学的に活性なhuTFh存在

レセプターーリガンド反応のような特異的結合反応の産物を意味 している。代表的複合体としては、免疫反応度物及びここでです。 VI/VIaと示されているところの組織因子一因子VI/VIa結合反応度物がある。

好ましい態機において、huTFh結合部位領似物は、少なく とも第1図に示されている30~35番のフミノ設残器を表わし ている次に示すアミノ政残器配列:

- VNQVYT-

を含んでいる。

さらに好ましくは、 h u T F h 結合部位質似物は、少なくとも、次のフミノ酸残器配列:

- -VNQVYTVQIST-及び
- LYYWKSSSSCKKT-

のうちの1つを含んでいる。

これらの配列は、第1図で示すところの各々、30~4.0及び 155~167番の、huTPhのアミノ酸残落を示している。

さらに一層好ましい場合は、Au TP A 結合部位類似物は第1 図で示すところの、各々26~49番及び146~167番で表わされている、次のフミノ放残基配列;

- EPKPYHQVYTVQISTKSGOWKSKC . AU
- VFGKOLTYTLYYHKSSSSGKKT .

からなる罪から選ばれたアミノ酸残基配列を含む。

好ましいhuTPh結合部位ポリペプチド頻似物は第1表で示されているアミノ設殊器配列を含んでいる。

第1度

名 称*	アミノ酸凝蓄配列
p24-35	H-EHEPKPYNQVYT-OH
p25-49	H-EPKPVNQVYTVQISTKSCDWKSKC-OH
p144-159	H-RDVFCKDLIYTLYYNK-OH
p146-167	H-VFGKDLTYTLYYWKSSSSGXKT-OH
p159-169	H-IYTLYYWKS55SGKKTAK-OH
P157-169	H-YWKSSSGKKTAK-OH
p161-189	H-855GKKTAKTHTHEFLIDVDKGEHYCFSV-OH

a. 各ポリペプチドの実験名は第1図の、含まれているアミノ 酸残益配列を変わしている。

ポリペプチドp26~48、p146~187及びp161~ 189も、抗ねuTP h 抗体分子がカuTP h に結合するのを中和(競争的阻害) する能力を特徴としている。抗ねuTP h 抗体のh uTP h への結合を中和する能力をもつ本発明の他のポリペプチドは、第2表に示されているものである。

第 2 表

2 4

アミノ酸残基配列

p1-30	H-SGTTHTVAAYHLTWESTHFKTILEWEPKPV-OH
p40-71	H-TKSGD#KEKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTY-OH
p41-49	H-KSGDKKSKC-ON
p56-71	H-ECDLTDEIVKDVKQTY-OH
p72-104C	H-LARVESYPAGHVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLC-OH
p94-123	H-YENSPETTPYLETHLGQPTIQSFEQVGTEV-OR
p190-209	H-QAVIPSRTVNRKSTDSPVEC-OH

a. 実験名に付けられた。C は、タンパク質結合のためのリンカーとして、示されている配列に付け加えられたシスティ

れる。リンキングに使われる臭型的アミノ酸残器は、チロシン、システィン、リジン、グルタミン酸及びアスパラギン酸とそれに 頻するものである。さらに、本発明のポリペプチドは、末端3H。 器アシル化、例えばアセチレーション又はチオグリコン酸アミデーション、ターミナルカルポキシアミデーション、例えば、アン モニア、メチルアミン、その他により配列が体動を受けていることで、天然の配列とは異なることがある。

キャリャー・ハブテンのように、当分野でよく知られているリンカーを介してのキャリヤーとの結合の場合、本発明のポリペプチドは、huTFhと免疫反応する抗体を誘導することができる。免疫学的な交差反応性の明白な原則からみて、本発明は、第1表及び第2表で示されているポリペプチドの流原的に関連したバリアントも考案している。 抗原的に関連したバリアント とは、第1 表もしくは第2 表のポリペプチドの、少なくとも6個のアミノ酸残益配列領域を含み、かつ、第1 表又は第2 変のポリペプチド及び huTFhと免疫反応を起こす抗体分子を誘導することができるポリペプチドのことである。

また、ポリペプチドがリン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散した、 h u T F h 結合部位ポリペプチド類似物の水性溶液を含む組成物を、本発明は考案している。 典型的なリン脂質:ポリペプチド重量比は、約5:1から200:1、好きしくは約30:1~80:1、さらに好ましくは、約45:1~55:1の範囲にある。リン脂質中に分散して使用するのに通している好ましい h u T F h 結合部位類似物をセクションI の第4 表にリストした。

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの分野ではよく知られているいくつかの方法で合成することができる。使用しうる多くで技術のすぐれたまとめは、J. H. スチワード (Steward) 及び

ン残益を示している。.

本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドが因子は/VI a への結合に対し、本来の組織因子と観合でき、そして、または、h u T P h に対する抗 h u T P h 抗体分子の結合を聴合的に 阻害しつるかぎり、 h u T P h の アミノ酸残器配列と同一である必要がないことを理解すべきである。 それ故、本ポリペプチドは、 使用する際に有利となるような、保存的、非保存的にかかわらず挿入、欠失及び置換のような種々の変化を与えることができる。

保存的電換には、あるアミノ設残蓄が他の生物学的に関数の残 落に置き換ったものである。保存的置換の例には、イソロイシン、 パリン、ロイシン又はメチオニンのような確水的残器間の置換又 は、アルギニンとリジン、グルタミン数とアスパラギン酸又はグ ルタミンとアスパラギン及びそれに領するもののような医性残蓄 間の置換がある。また。保存的置換。という語句には、もし、ポ リペプチドが、必要とされる箱合価性を示すならば、未置換の元 4のアミノ設の代りに、置換されたアミノ設を置いることも含ま

本発明のポリペプチドが、1つ以上の保存的、もしくは非保存的置換をしているために、本来のhuTPhの配列と同一ではない場合、本発明のポリペプチドがラベル又は固体マトリックス、又はキャリヤーにうまく固定する。リンカー。を提供する目的で、その各末端に付加的残蓄をつけ加える場合は別にして、アミノ酸残蓄の通常せいぜい約20パーセント、より普通には、せいぜい10%が置換している。本発明のポリペプチドと共に使用されるラベル、固体マトリックス及びキャリヤーは以下に述べる。

通常、アミノ酸残差リンカーは、少なくとも1残器であり、また40以上の残器のこともあり、しばしば1~10残器が用いら

J. D. ヤンダ (Young) の"固相ペプチド合成" (1969年、サンフランシスコ、N. H. フリーマン (Freeman) 社) 及びJ. メイエンホーファー (Reienboser) の"ホルモン性タンパク質及びペプチド" (1983年、アカデミァクブレス社 (ニューヨーク)、2 慰、4 5 頁) が固相ペプチド合成について、また8.シュローダー (Schroder) とK.クブケ (Kubke) の"ペプチド" (1965年、アカデミックブレス社 (ニューヨーク) 1 巻) が古典的な徴相法について行なわれている。

R.接種物

別の態機において、本発明のポリペプチド又は、その抗原的に関連したパリアントは、生理学的に許容しうる水性系の振知組成物として、その効果的量が投与された時、huTFhと免疫及反応する抗体を誘導さることができる授和物となる。種々の文法型の一接独物となる。種々の現型に用いられる活性の成分として、本発明のポリオードをおいるのに用いられるとき、そのポリペプチドは、単独で、又は結合体としておいるれるとき、そのでは、ポリペプチド重合体として用いられるのであるが、表現の信仰の大め、本発明のポリペプチドの種々の遺様は、金て、・ポリペプチド・という語及びその種々の文法型で呼ばれていることを理解されよう。

約35以下のアミノ改列基を含むポリペプチドに対し、すでに 記されているように抗体生産の誘導のためには、キャリヤーに結 合したペプチドを使用する方が望ましい。

すでに記してきたように、1つ以上の付加的アミノ政務高をポ リペプチドのキャリヤーへの結合を助けるため、そのポリペプチ ドのアミノ又はカルポキシ末端に付加することができる。ポリペ

平成 7.12.20 発行

プチドのアミノ又はカルボキシ末端へ付加したシスティン残益は、ジスルフィド結合を介して、結合体を作るのに特に有用であることが分っている。しかし、結合体を調整の当分野でよく知られている他の方法も使用しうる。代表的付加結合法にはミカエル付加反応度物、グルタルアルデヒドのようなジナルデヒド(クリプスタイン(Kiipatein)等(ジャーナル・オブ・インフェクシャスデシーズ(J. Inpect. Dis)、しょて巻、318~3.26頁、(1983年))及びそれに類するものの使用、又は、キャリヤーに対し、アミド結合を生ずる、水溶性カルボジイミドの使用ような、カルボジイミド法の使用が含まれる。活性官能基を介してのタンパク質の結合については、オーラメアス(Aurameas)等のスカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Scand. J. Immunol.)8巻、補1、7、7~23頁(1978年)を参照せ

有用なキャリヤーは、当分野ではよく知られており、一般的にはタンパク質ぞのものである。そのようなキャリヤーの代表例としては、キーホール、リンペット、ヘモシアニン(KしH)、エデスチン、チログロビン、子ウシ血清アルブミン (BSA) やヒト血滑アルブミン (HSA) のようなアルブミン類、ヤギ赤血球(SRBC)のような赤血球類、テタナストキソイド、コレラトキソイド、ポリ(Dーリジン: Dーグルタミン酸)のようなポリアミノ酸及びこれに類するものがある。

キャリヤーの選択は、その接種物の最終的使用法に依存してお り、本発明に特に関係しない基準に基づいている。例えば、接種 される動物中で不都合な反応を起こさないキャリヤーが選択され るべきである。

本発明の接種物は、典型的には、キャリヤーに結合した結合物

びイムノグロブリン分子の免疫学的に話性な領域すなわち抗体結合部位又はパラトープを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来のイムノグロブリン分子、実質的に本来のものと同じイムノグロブリン分子及びFab、Fab、、F (ab、)。及びF(v)として、当分野で知られている領域を含む、パラトープを含有する、イムノグロブリン分子の一部がある。

本発明の抗体組成物は、huTPh及び本発明の特異的ポリペ ブチドの少なくとも1つと免疫反応を起こす抗体分子を含むこと を特徴とする抗ペプチド抗体である。

例えば、huTFh及び銀機因子結合部位のポリペプチド類似物と免疫反応する抗体分子を含む、本発明の抗体組成物は組機因子が因子リプリュと結合する能力を中和できる。従って、好きしい抗体組成物は、huTFh及びp26-49又はp146-167と反応し、かつ、p204~226と実質的に免疫反応しない抗体分子を含むものである。huTPhに対して生ずるポリクローナル抗血液は、p204-226免疫反応する抗体を含むことに住意すべきである。このように、抗204-226免疫反応性が実質的にないことが、本抗体組成物と従来の報告されているものとを区別する特性となっている。

本発明の抗体組成物の典型的生産は、未乳動物を、本発明の接種物で免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有するよ乳類抗体分子を誘導することによって行なわれる。 さらに、その抗体分子をそのホ乳動物から収集し、例えば、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーのような提来技術によって、その必要量を早離する。このように生産した抗体組成物は、なかんずく、体研法及び身体サンプルにおけるトuTPトを検出するための、本発明のシステムで用いることができる。

として、効果的な免疫環量の本発明のポリペプチドを含む。他の事項の中で、単位投与量当りの効果的なポリペプチド量は、当分野ではよく知られているように、接種される動物種、その動物の体質及び選択した接種レジメンに依存する。異型的に、接種物は、接種(投与)当り約10マイクログラムから約50ミリグラムのポリペプチドを含んでいる。

本発明の接種物に用いられている。単位投与。という語句は、各ユニットが、必要とする希釈剤、すなわち、キャリヤー又はピヒクルと共に望ましい免疫原的効果を座むのに必要な予め決められた量の活性物質を含む、動物に対する1回の投与に通した物理的に分離した単位を意味する。本発明の複種物の新しい単位投与に関する明相は、回活性物質の独特な特性及びその独自の免疫学的効果、及び殴ここで幹額に公開されている動物中での免疫学的効果、及び殴ここで幹額に公開され、かつ直接依存しており、これらが本条項の特徴となっている。

典型的には、接種物は、水、食塩水又はリン酸種街食塩水など の生理学的に許容された(受容できる) 希釈剤中にポリペプチド 一結合体を分散させることにより、乾燥した固体のポリペプチド 結合体から水性組成物を調製することができる。

また、接種物は特収剤の一部として、アジュバントを含んでいる。完全フロイントアジュバント (CFA)、不完全フロイントアジュバント (IFA)及びミョウバンのようなアジュバンドは、当分野ではよく知られており、いくつかの会社から市販されている。

1. 抗体及び抗体組成物

後ゃの文法型の"抗体"という語は、イムノグロブリン分子及

モノクローナル抗体組成物も、本発明で考案されている。 検出 限界内で、モノクローナル抗体組成物は、効果的に A u T P A を 結合しうる、唯一種類の抗体結合部位を含んでいる。従って、実 型的に、本発明のモノクローナル抗体組成物は、それが h u T P A 以外のタンパク質を結合できる抗体をたとえ含んでいたとしても、 A u T P A への結合数和性を示す。ひとつの放機において、モノ クローナル抗体組成物は、 A u T P A 及び、組織因子結合部位の ポリペプチド類似物、好ましくは p 2 5 ~ 4 9 又は p 1 4 6 ~ 1 6 7 と免疫反応する抗体分子を含んでいる。

他の腹機において、本発明は、トロTFトと免疫反応し、 トロTFトにより開始する疑集を阻害する抗体分子を含む抗凝集 (中和) MoAbを考案した。さらに凝集を阻害する好ましい MoAbは本発明のポリペプチド、好ましくは、トロTFト結合部 位ポリペプチド類似物、及びさらに好ましくは、第1表で示され ているポリペプチドと免疫反応することを特徴とする。

他の職機において、抗凝集MoAbは、huTPh及びhuTPh: 因子リンリョの複合体と免疫反応し、huTPhによって開始する凝集を限害(中和) する抗体分子を含んでいる。さらに、好なしい抗凝焦MoAbはhuTFhポリペプチドp1-30又はp26-49と免疫反応することを特徴とし、またこれは、huTPhポリペプチドp56-71と免疫反応しないことが好ましい。

また、本発明は、組織因子の耐象を開始する能力を中和しない 流体分子を含む非中和性モノクローナル流体組成物も考案した。 モのような組成物は、 h u T F h 及びポリペプチドp l - 3 0 と 免疫反応し、かつ、ハイブリドーマTF 9 - 1 0 H l 0 により生 歴 (分泌) される流体分子を含むことが望ましい。

本発明のモノクローナル抗体組成物は、適当なポリペプチド特

異性をもつ抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培 地を含む、モノクローナルハイブリドーマの培養を開始すること によって生限することができる。

このハイブリドーマが培地中に、その抗体分子を分泌するのに 十分な象件及び時間、培養を維持する。それから、抗体合有培地 を収集する。さらにこの抗体分子を従来法により草醚する。

これらの組成物の調製に有用な培地は、当分野ではよく知られておりまた、市販されていて、合成培養培地、同血は期限マウス及びそれに類するものが合まれている。代表的合成培地は、4.5 g/lのグルコース、20 mグルタミン及び20 Mカシ胎児血清を補足した、グルベコ最小培地(DMBM:ダルベコ(Bolbecco)等、ヴィロロジー(Vivol)、8巻、396頁(1959年))である。代表的同血繁殖マウス株はBolb/cである。上述の方法で生産したモノクローナル依体組成物は、例えば、huTPh合有免疫反応の形成が必要である、診断及び治療法で用いることができる。

.1.ハイブリドーマ

本発明のハイブリドーマは、huTFhと免疫反応する抜体分子を生産することを特徴とする。さらに、好をしいハイブリドーマは、huTFhで開始する破集を阻害し、また、望ましくは、木発明のポリペプチド、好ましくは、huTPh結合部位ポリペプチド類似物、そしてさらに好ましくは、第1裏に示されているポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴としている。さらに好ましい路機においては、抗凝集MoAbは、非ヒト、霊長観、TFと免疫反応する。

他の好ましい態後において、本発明のハイブリドーマはbulph 及びhuTPh:因子ほどほよの複合体と免疫反応し、buTFb

VIa複合体形成速度の減少によると考えられている。従って、生体内において、huTPh因子VI/VIa結合部位ポリペプテド類値物の投与は、凝集やある炎症反応のような、退機因子の因子VI/VIaへの結合により開始する生理学的応答を調節するのに用いることができる。好ましい態機において、このポリペプチドは、先に述べたように、リン脂質中に分散して投与される。

生体内における超級因子による因子リグWaの結合を四部する他の方法は、本発明の抗体組成物(抗ペプチド抗体)又は抗凝集MoAbの効果量を静脈注射により投与することである。この抗体分子は、パラトピック領域を含み、かつイムノグロブリン分断片F(ab')。、Pab及びそれに関するもののような、Fc 領域を含まないものである。治療的に効果的量の抗凝集MoAbは、体重は当り15ggから5g、好ましくは体重は当り、約10gμgから約1g、より好ましくは、体重は当り約150μgから約500μgの範囲である。

他の監操において、本発明のMoAb、抗磁集MoAb又は非中和性MoAbの抗体分子を抗腫瘍試取に結合し、抗腫瘍治療組成物が作られる。このようにして作った、効果量の抗腫瘍治療組成物を、その表面に組織因子を発現する腫瘍相応を有する被検者に投与することができる。このような腫瘍相応の代表例は、胸及び肺のがん細胞である。

ここで考案された抗腫瘍は凝の代表例にはいい、「、***Re、***Bi 及びこれに領するもののような放射性核構がある。放射性核構結 合モノクローナル抗体治療組成物の製造住及びその使用法は、コ ザック(Jozek)等(トレンズ・イン・パイオテクノロジー

(Trends in Biotech.) 4巻、259~264頁(1986年)) により報告されている。 平成 7.12.20 発行

により開始する森集を中和する抗体分子を生産する。さらに、 トuTFh:因子は/Usの複合体と免疫反応するハイブリドー マ生度抗体は、該抗体の、トuTFhポリペプヂドpl-30又 はp26-49、好宝しくはその両方と免疫反応し、かつ、より 好宝しくは、該抗体分子が、ポリトuTFhポリペプヂドp56 -71とは免疫反応を起こさないことを特徴としている。

望ましい免疫特異性を有する、すなわち、特別なタンパク質をして、またはポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生困する (分泌する) ハイブリドーマの作成法は、当分野ではよく知られている。特に、ニマン(Himan)等により報告されたハイブリドーマ技術は(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Pvoc. Nati. Acad. Sci.) USA、80巻、4349~4353頁(1983年))、有用である。好ましいハイブリドーマを、例130章5表に示した。

ハイブリドーマ増援物TP8-5G9、TP9-6B4及びTP9-10H10はブタペスト協定に促がい、1987年3月27日ATCCに保管され、各々是理番号、HB9382、HB9381及びHB93883が割当てられた。

K. 治療方法及び組成物

本発列のトロTFト因子以/VIIIの結合部位ポリペプチド質似物、抗体組成物、モノクローナル抗体組成物及び抗凝無MaAbは各々、生体内において、組織因子による因子VI/VIIIの結合を調整するのに用いることができる。

例えば、huTFh因子は/VIIaの結合部位ボリペプチド類似物は、効果量を被検者に投与したとき、因子VI/VIIaの組織因子への結合を触令的に関密することができる、医療的に許容しうる 組成物に用いることができる。この阻害は、組織因子・因子VI/

投与されたポリペプチド又は抗体分子含有組成物は、溶液又はサスペンジョンの形をしているが、ポリペプチドは、錠剤、丸類、カプセル、放出持続製剤又は粉末の形もとる。どの場合にも、この組成物は、0.10%~95%、好ましくは、25%~70%の活性成分を含んでいる。

ポリペプチド又は抗体分子組成物は、中和した医原的に受容し うる場の形に調整することもできる。医原的に受容しうる塩には、 設付加塩 (ポリペプチド又は抗体分子の遊却しているアミノ番で 形成される) 及び、例えば、塩酸又はリン酸のような無機酸び又は、 砕酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸及びこれら に刻するもので形成されるものがある。遊解したカルボキシル差 で形成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニンクム、 カルシウム又は映の水酸化物のような無機塩基及びイソプロビル アミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエクノール、ヒス チジン、プロカイン及びこれらに領するもののような有機塩番か ら誘導される。

治療用の思りペプチド又は抗体分子含有組成物は例えば、単位 投与量の注射によるように、局所的に又は静脈注射により層便に 投与される。

本発明の治療組成物に対して用いられる。単位投与。という語 句は、ヒトに 1 回投与するのに適した、必要とされる希釈剤、す なわち、キャリヤー又はピヒクルと共に、愛ましい治療効果をあ げるために計算された、予め決められた量の活性物質を含む、物 理的に分離されている単位を意味する。

指組成物は、役与物形状に適した方法で、治療的に効果的な量が投与される。投与される量は処置される検体、活性成分を利用する検体の血被凝集システムの容量及び窒虫しい組織因子結合能の阻害又は中和度に依存する。投与される必要の人には一定のないである。 しかし、適当なポリペプチド投与範囲は、1日に、患者当り、1から5ミリグラムの活性物質というオーダーであり、役与の径神に依存する。第1回投与及び二次免疫の適正な治療計算もいろいる。次段型的には、一次投与後、1時間以上の関係をおいて、さらに注射又は他の方法による投与が繰り返えされる。別に、血液中、10ナノモル濃度から10マイクロモル濃度を維持するのに十分な、投続的静脈注入注も考案されている。し、診断システム

本発明のキット型の診断システムは、少なくとも1回の検定に 十分な量の、分包試測として、本発明の発現タンパク質ポリペプ チド、抗体組成物又はモノクローナル抗体組成物を含んでいる。 また、この分包試裏の使用幾明書も含まれているのが普通である。 典型的に、"使用幾明書"には、試演機度には、混合する試算

イエノロジー (Scand. J. Janunol.) 8巻、補版7巻、7~23 頁 (1978年)、ロッドウェル (Rodvell) 等の、パイオテクノロジー (Biotach.)、3巻、889~894頁 (1984年)及び米国特許第4,493,795号参照。

また、な断システムは、好ましくは分包の、特異的試薬を含む、 "特異的結合試棄"は、本発明の試薬を選択的に結合できる分子 であるが、本発明のタンパク質発現産物、ポリペプチド又は抗体 分子ものものではない。代表的な特異的結合試棄は、抗体分子、 補体タンパク質又はその断片、タンパク質人、血液凝集因子ログ 切っ、子ウシ組織因子及びそれに関するものがある。この特異的 結合試棄は、反応物が複合体の一部として存在するとき、これと 結合することが望ましい。

好ましい態後において、特異的結合試測はラベル化される。 しかし、その診断システムが、ラベル化されていない特異的結合試 策を含むとき、典型的には、この試現は、増市手段又は試棄として用いられる。これらの態様において、このラベル化した特異的 結合試策は、この増市手段が、反応複合有複合体に結合している とき、この増市手段に特異的に結合することができる。

本発明の診断キットは、血清、血張又は尿のような体液サンプル中の b u T F h の存在又は量を検出するのに " イライザ・方式で用いることができる。 " イライザ法" は、サンブル中に存在する抗原又は抗体量を検出及び定量するための、固相に結合した抗体又は抗原及び酵素 - 抗体粘合物を用いた、砂素粘合免疫吸着検定法のことである。イライザ法の説明は、全て参考としてここに組込まれている、1982年、C A 州ロサンゼェルスのラング・メディカル・パブリケーションから出版された、0. P. サイツ (Sites) 等の基本的及び臨床的免疫学、第4編、

平成 7.12.20 発行

とサンブルの相対量、試取ノサンブル混合物の維持時間、温度、 パッファ条件及びそれに鎖するもののような、少なくとも1回の 検定法のパラメーターを明確に記述してある。

好ましい態機において、さらに、本発明の参照システムは、試 現を含む複合体の形成を知らせるラベル又は指示手段を含んでい 。

ここで用いられているように、種々の文法型の・うベル・及び・指示手段。は、複合体の存在を示す検出可能な信号を度み出すのに直接又は間接的に関連する単一の原子を登味する。。生体内・うベル又は指示手段とは、被検制の依体又はモノクローナル抗体組成物の一部である抗体分子、発現したタンパク質、又はポリペプチドに結合又は組込まれていることもあるし、また別々に使用されることもあり、また、これらの原子とは分であれば、既体的診断化学においては、よく知られているものであり、れば、既体的診断化学においては、よく知られているものであり、たれらが、他の新しいタンパク質、天発明の一部を構成する。と

ラベルの結合、すなわち、ポリペプチド及びタンパク質のラベル化は、当分野ではよく知られている。例えば、ハイブリドーマによって生産される抗体分子は、培養培地中の成分として与えられたとき、放射性関位元素含有アミノ酸の代別的取込みによるラベル化が可能である。例えば、ガルフレ(Galfre)等の、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Meth. Eazymol.)73巻、3~46頁(1981年))参照、活性化官能基を介するタンパク質の結合又はカップリング技術は特に有用である。例えば、オーラメアス(Aurammas)等の、スカンジナピアン・ジャーナル・オブ・

第22章及び米国特許第3,654,090号、第3,850,752号及び第4,016,043号に報告されている。

このように、好ましい軽操において、本発明の発現したタンパク質、ポリペプチド又は抗体は固相マトリックスに固定され、この珍斯ンステム中に、分包されている固体サポートを形作ってい

典型的に、この試験の固体マトリックスの固定は、他の固定法もあるが、この分野でよく知られている水性媒体からの吸着が用いられている。

有用な固体マトリックスは、当分野でよく知られている。このような物質には、ファルマンア・ファイン・ケミカルズ社(NJ州、ビスカタウェイ)から、セファデックスという登録商ほで市販されている、深橋デキストラン:アガロース: IL州、北ンカゴ、アポット・ラボラトリーズ社から市販されている直接約1ミクロン〜約5ミリノートルのポリスチレンに一ズ;シート状、ヒモ状又はヘラ状のポリ海化ビニルポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロース又はナイロンベースの積物、又は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニルでできているチューブ、プレート又はマイクロブレートのウェルが含まれる。

ここで述べられている診断システムの試策、ラベル化結合試策 又は、増巾試策は、液体分散物として溶液として、又は、例えば、 凍結乾燥型のような、実質的に乾燥粉として提供される。指示手 段が酵素である場合、この酵素基質も、システムの別の包むに提 供される。先に述べた、マイクロブレートのような固体サポート 及び1つ以上のバッファも、この診断検定システム中に別にパッケージされた要素として含まれている。

診断システムに関連して、ここで環論されているパッケージは、

は断システムにおいて選常使われるものである。このようなパッケージには、ガラス及びプラステック製の(例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリカーボネート)ボトル、パイアル、プラスチック及びプラスチックホイルでラミネートした外袋物及びこれらに類するものが含まれている。

11. 检定法

本発明は、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物中に含まれている、発現されたタンパク質、ポリペプチド又は抗体分子を含む複合体を生産することにより h u T F h を検出する方法を考案した。当業者には、これらの複合体を形成するのに利用できる多くの、よく知られている医床的診断の化学手段があることが理解できよう。後って、典型的検定方法がここで説明されているが、これは、本発明を制限するものではない。

1 曲路路出

被検者中に存在する血栓検出法が考案された。生体内での指示手段と結合する抗体を含む本発明の、効果的量のモノクローナル 抗体組成物を、被検者に静脈注射する。好ましい照機において、 ラベル化した抗体は、huTFh及び第1変及び第2変のポリベ プチドと免疫反応するがp204~226とは反応しないもので、 好ましくはハイブリドーマTF8~509、TP9~584又は TP9~10H10から生産されたものである。

それから被検者を、ラベル化した抗体分子が、血栓の一部に存在する h u T P h と反応し、 複合体を作るのに十分な決められた時間、及び、好ましくは、未反応の抗体分子が体内から一掃されるのに十分な付加的時間維持する。その後、被検者を、生成した複合体の存否及び好ましくはその位置について検定する。

2.身体サンブル中のhuTFhの検出

- 1 6 2 -

その後、残留脳組織固体を各々、その固体をヘブタン: ブタノール (2:1) 25ミリリットル (ms) 当り、組織箇体18の割で、ヘブタン: ブタノール (2:1) と混合することによって行う5回の抽出を行ない、ついで濾過により、その固体を回収する。最後の濾過後、残留脳組織固体を再び大気圧下、約20で一晩で乾燥し、配腹脳組織粉末を作り、必要になるまで、-80でに保存する。

つづいて、脳翅微粉末25グラムをTS/BDTAバッファ(100ミリモル譲渡(mM)RoCを、50mMトリス・塩酸(せ7.6)、0.02 MTツ化ナトリウム、5mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、0.1 M(V/V) トリトンX-100(ポリアリルエチレン・9-オクチルフェニルエーテル))500mAと混合し、ついて4でで一晩農神する。さらにこの混合物を15.300×8で1時間遠心する。生じたベレットを500msのバッファA(100mMNaCを、50mMトリス・塩酸(pR7.5)、0.02 MT ジャン・1 00)に再想酸し、スラリーを作る。窒温で1時間の撹拌後、このスラリーを上述のように遠心する。生じた上津を回収し、凍結乾燥した後、100msのパッファAに溶かして、カロTFト合有福抽出溶液

2. h υ T F の 凝血活性を測定するため の 凝集検定法

平成 7.12.20 举行

具体サンプル、好定しくは体液サンプル中のトuTFhの存在、及び好定しくはその量を検出するため、競合的又は非競合的な、建トの不均一及び均一検定技が利用できる。別えば、液体体の液サンプルと、ラベル化したp26-49を、マイクロブレートのウェルの内型に固定した、ハイブリドーマTF8-5G9又はTF9-10H10から生更された抗体分子を含固体サンプル中に存在するトuTFh及びラベル化したp26-49が、固体サポートとして存在する抗体分子への結合を競争し、固体発症の定中がな時間、生物学を発し、固体発症をあるのに十分な時間、生物学を発し、固体発症をあるのに十分な時間、生物学を発症を動からなり強く。未結合のラベル化p26-49を受症を動たしたラベル化p26-49の量を測定し、その差により、トuTFhの存在を検定できる。例

次に示す例は、本発明の以明を意図したもので、これを制限するものではない。

1.組織因子含有ヒト脳抽出物の調整

生技で得られた正常なとトの脳を12時間以内に処理するかもしくは、-80でに保存する。その酸酸及び大脳を除き、ついて 残存する脳部分を、ポリトロンホモジナイザー (NY、ウェスト パリー、ブリンタマン、インスンラミント社)を用いて、 等等量 の冷(0で)アセトン中でホモジネートした。このホモジネート したものをさらに3倍容の冷アセトンと混合し、その組織 国体で 分を、焼結ガラスロートを用いて建過して回収した。各々7回の 2倍容の冷アセトンとの混合及び引きつづく建過により、 残容す 体からアセトン 可溶性物質を抽出した。 最後の確遇の後、 残容す るアセトンを、20で、一味、 残容固体から大気圧下でエバポレ

50mMトリス・HC & (pR7.5)、0.1%子ウシ血清アルブミン)で希釈した h u TF を含むサンプル100マイクロリットルを、100 p & のクエン酸化血素と混合した。25mMCaC & 源 液液 100 μ & を混合し、凝集反応混合物を作り、凝集が始まるまでゆっくりと描らした。CaC & 』 添加と、凝血形成の間の時間を測定した。それから、h u TP 活性の環準曲線を、砂で示した凝集時間と希釈率をプロットすることにより作った。代表的環準曲線を第3回に示した。

3. ね u T F の親和性単脳のための、因子 Vi 含有固体サポートの

ヒトの因子リノロコを参考文献として組込まれている、フェア(Pair)の報告(プラッド (Blood)、62巻、784~91頁(1983年))に従って早難した。この単超した因子リノロコを、アガロース固体マトリックスに結合するため、4でで一晩、その5ミリグラム (mg) を、0.1 M2- (N-モルホリノ) エクンスルホン酸 (MES) (pH6.5) に対して透析した。塩化カルシウムを最終濃度1mMとなるように添加した。それから因子リノリュを4m2のアファゲルー15 活性化アガロースピーズ (CA州、リッチモンド、バイオラド・ラボラトリーズ社)と混合し、生じた結合反応混合物を、製造業者が推薦するもの(バイナラド)に従って4次、4時間の回転処理を行った。

回体サポート上の過剰タンパク質結合館位を、その固体サポートを、0.1 Mグリシンエチルエステル中、 盗温で 1 時間投搾することにより、 ブロックした。その後、この固体サポートを、 洗結ガラスロート上各約20ekの11)パッファ A、(2)1 M NaCl会有バッファ A、(3)5 mM BDTA含有バッファ A及び(4)1 mM C a C l 。含有パッファ Aをこの頃序で用いて洗浄した。それか

ら通剰の液体を波圧下で験き、半乾温状の粒子物質(ケーキ)を 作った。

4.huTFの因子センVI=親和性による単語

0.1 Mのグリンンエチルエステル及び 0.1 M MES(pH&5) を含む 2.0 mをの存限を、 2.2.5 mをのフィゲルー 1.5 アガロースピーズ (パイオラド) と混合し、結合反応混合動を作る。この結合反応混合物を重温に1時間維持する。この生成した結合物を、焼結ガラスロート上、1.0 倍容のパッファ1を用い、減圧下で越過することにより快冷し、グリンンエチルエステルーアガロースケーキを作る。

例1で調製した30mをの脳油出溶液を、1mM塩化カルシウムを含む5リットルのパッファAに対し、4で、1機選折を行う。透析した脳油出物を、グリシンエチルエステルーアガロースケーキと混合し、固度相反応混合物を作る。回転しながら室温で2時間増持した後、この面液相を焼結ガラスロートを用いて減過することで分離する。この液相を回収し、最終視度mを当り10ユニットとなるようにトラシロール(MO州、セントルイス、シグマケミカル社、アプロチニン)と混合する。この回収した液相を例3で調製した因子リン以mノアガロースケーキと混合し、第2の固ノ液相混合物を作る。

この混合物を回転しながら、一晩もでに維持し、カロTP-因子相グ収 a 含有固相度物を形成させる。その後、この固相及び液相を光に述べたように維通により分離する。 焼結ガラスロート上に残留物する固相を 1 s M 塩化カルシウムを合むパッファ A 2 5 a 8 で洗浄した。さらに、この固相を焼結ガラスクロマトグラフィーカラム (0.5 × 1 5 cm、パイオラド) に珍し、6 a 8 の同流 浄パッファで洗浄した。上記の洗浄後、この固体サポートに結合

huTFを、10分の1容のTF8-5G9又はPAb100 (ATCC-TIB115;ここでネガティブコントロールとし で用いられているSV40ラージで抗原特異的抗体を生産するハ イブリドーマ)ハイブリドーマ培養上滑とともに、4でで1晩イ ンキュベートすることにより免疫沈裂化を行った。アガロースピーズ(MO州、セントルイス、ングマ・ケミカル社)上に固定したヤギの抗マウス1gCを、その 第1次免疫反応度物を吸収するのに用いた。このビーズを同パッファでよく洗浄し、結合した *** I-huTFを、DTT存在下又は非存在下、同パッファ中で5分間煮沸することにより溶出した。SDS-PAGE後、タンパク質パンドはオートフルオログラフィーで可視化した。

単離したAuTFを放射性ヨウ素化し、DTTで運だし、ついで10%アクリルアミドゲルでSDS-PAGE分析したとき、47kダルトンの見かけの分子量をもつ単一のメインパンドが頻繁された(第4図)。しかし、未運元のAuTFを同様に分析した場合は、およそ58及び47kDaの2つのパンドが相対的に等しい量で観察され(第5図レーンB)、このことは、少なくとも2つの異なる多きさのものの存在を示している。

非選元で観察されるこの2つのパンドに対する説明としては、 その大きな方、すなわち、泳動が遅いパンドは、非常に多くのグ りコシル化を受けたものか、付加的なプロセッシングを受けてい ないタンパク質を有しているのか、又は、付加的な、ジスルフィ ド語合で結合したポリペプチドと会合しているのかもしれないと いうものである。選元後の単一パンドの存在は、はじめの2つの 示唆と一致している。その後者の可能性は中でも一番大きいよう に思えるが、その小さいサイズの差のために、付加的ポリペプチ ド頃は、色素の場所又はその付近に泳動するような十分小さいも 平成 7.12.20 磁4

した h u T F を、焼結ガラスカラム上に保持されている固体サポートを 5 m M の P D T A を含む パッファ A で洗浄することにより、遊離 (溶出) させる。溶出した物質を1 m 2 画分づつ回収し、各画分について、例 2 で述べた方法により、 h u T P の存否を検定した。 h u T P 含有質分を集め、 4 でで、 1 % トリトンメー 1 00 を含む 6 リットルの T B S (1 5 0 m M No C 2、 1 5 0 m M トリス塩酸、 p H 7.5) に対して 1 執透折した。

このようにして作った透析物をつづいて、4倍容の冷アセトンと混合し、huTPタンパク質を沈疑した。この沈殿をおよそー10で、5000×8、30分間の遠心で無めた。生成したペレットを宣素雰囲気下で乾燥した。奥型的な収量は、駅間した脳組織粉末1ダラム(乾燥重量)当り、2×8のhuTPであった。

このようにして生じた単離トロTFサンプルをTBS/トリトン中に怒濁し、ついで、製造業者の指示に従がい(「し、ロックフェード、ピアス・ケミカル社)、ヨードゲンを用い、Na ***!でラベル化した(「し州、アーリントンハイウ、アマーシャム社、マイクログラム当り「5マイクロキューリ)。ラベル化後、過剰の未反応***1をTBS/トリトンを用いたセファデックスG25(NJ、ピスカタウィイ、ファルマシア社)での成塩クロマトグラフィーにより、ラベル化したトロTPから分離した。

**** I チベル化 h u T P 合有サンブルのラウリル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動による(S D S - P A G B) 評価は、レムリ(Lacenli)(ネイチャー(Natere)、227巻、680~685頁(1970年))の方法に従った。選元条件下で評価するサンブルに対しては、100 mM のジチオスレイトールを、サンブルバッファ中に合有させた。156 mM トリトンX - 100、50 mM トリス塩酸(p H 7.4)、150 mM NaC & 中の****!

のらしく、遺元後、10%アクリルアミドでは分離されないので あろう。15%のボリアクリルアミドゲルの選元及び非還元AutP の電気泳動は、単一の分離した軽減を示すのには失敗したが、い くつかの心量の、流く泳動するパンドが観察された(第5回、レ ーンA及びB)。これらの小さい、少量のポリペプチドは、以前 に報告されているように(ブローズ (Brose))等、ジャーナル・ オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 、260 巻:10917~20頁(1985年)及びゲハ (Gula) 等、プ ロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエ ンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、83巻、299~302 頁(1986年))、汚染物を示している。この可能性を明らか にするため、4.7kDa 及び5.8kDa のパンドは非還元ゲルか ら切り出され、その各々を、ジチオスレイトールで運元し、その 各々を、15%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEに かけた (第5図、レーンC及びD)。 58kDタンパク質は125 kD軽額及び47kD。重額であると分った。47kDa のタンパ ク賞を分析したとき、同分子量の重複のみが観察された。このよ うに、両者は、SDS-PAGEで同様の挙動をもつ重旗を保有 していた。

直接軽額の存在を示すため、「**」ートuTFを、huTF特 実的モノクローナル抗体TF8-5C9で免疫沈酸化し、それを 還元剤存在下の電気泳動にかけた。主要な47kDaパンドがお よそ、12.5kDaの分離したパンドとともに健康された(第6 図、レーンA)。還元化しないサンプルの電気泳動でおよそ47 kDa及び58kDaのパンドを生じたが、低い分子量のポリペプ チドは生じなかった(第6図、レーンB)。また非運元huTF の電気泳動は、プローズ(Broze)等(ジャーナル・オブ・パイオ

平成 7.12.20

ロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、260巻:10917 ~20頁(1985年))により示唆されているhuTP重観のダイマーと一致する、少量の90kDaタンパク質も示した。.

huTF軽額が重額からタンパク質の分解によって生ずるという可能性を研究するため、SDS-PAGEにより単離した軽額及び重額を、N末端アミノ酸配列分析にかけた。

重領及び経領をSDS-PACEで分離し、アパーソールド (Abersold)等の高 pH 法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. 81ol. Chea.)、261億、4225~4238 貝 (1986年))を用い、活性化した、アミノ被復ファイパーガラスフィルター上に電気プロットした。このタンパク質パンドを、蛍光染料(アパーソールド(Abersold)等、上記)により、このブロットを可視化し、切り出し、モして、まだファイパーガラスに結合したまま、PT H 誘導体のオン・ラインHPLC分析を、用いたアプライド・パイオシステムズ 470 A タンパク質シークエンサーで配列決定した。別にタンパク質パンドをコマージ・ブルーによる染色によりゲルを可視化し、シークエンシングのために、電気役出した。同方法とも等しい結果を与えた。

トロTP重額のマイクロシークエンシングは、ほぼ等モル量のアミノ政配列で一致した結果となった。ほとんど全ての場合、各アミノ政務高は2サイクル離れて、2度出現する。これは、長さがN末端で2残器異なるトロTP重額の2つのパリアントがねじれたN末端をもつことの明白な証拠である。大きい方のパリアントのN末的は、非幹定のアミノ致Xを含む

Ser-Gly-X-X-Asn-Thr-Val-Ala-Ala-Tyr-X-Leo-Thr-Trp-Lys-aer であることが決選された。

軽減の配列決定するいくつかの試みは、プロックされたN末塔

タンパク質染色によって、会合した小ポリペプチド額を検出する でとは開鍵である。

イン・ビトロでは、単量体 A u T F が凝集を開始するにもかかわらず、 A u T F による凝集の生理的開始は、細胞楽面で起こる。 経質は、返接的凝集検定法で検出することができる、 A u T F 機能又は機構において重要な役割をはたしていることが推察できるであろう。例えば、軽質は、因子 W Z y a の退続因子への結合の正の協同性を説明すると仮定されてきている、因子 W に対する 2 つのサブユニットレセプターのアッセンブリーに関与している可能性がある。別に、細胞表面上の構造ドメインでの A u T F を 機能及び、細胞表面上での A u T F 医性の制御は、 A u T F 軽減に仲介されるのかもしれない。

N結合オリゴ婦の役割は、**** 1 ー h u T F サンブルの脱グルコシル化により試験した。 低分およそ3.6×10° カウントを含む、ラベル化トu T F 約1274ナノグラムを0.4ユニットのグリコペプチダーゼド(I N 州、インディアナポリス、ベーリンガー、マンハイム・バイオケミカルス社)、20mM トリス塩酸(p H 7.5)、10mM EDTA、及び1 14トリトンX-100を含む20mmをの溶液と混合し、37でに16時間維持した。それから、この欧グリコシル化した度物を、先に述べたSDSーPAGEで分析した。

第7回、レーン 4 及び 5 に示した、脱グリコンル化の研究結果 は、 5 8 k D a の h u T P は、別のタンパク質部分、すなわち軽 鎖の存在のため、 4 7 k D a のものよりも、高い相対分子量を示 すことを表わしている。

・このようにして早離した h u T P を、 再脂質化し、そのプロコ アグラント活性が再構成された。 最高の活性を有する再脂質化組 と一致して、なんら配列の情報を与えなかった。しかし、LoTFの重賞及び軽減は、単間されたhuTFに対して生じた、2つのウサギの抗huTP抗血液及び28個の、マウスモノクローナル抗体の全てが、重領のみに結合することが分っていることから、抗原的に全く別のものである。それゆえ、軽減は、重賞のタンパク質分解断片とは考えにくい。さらに程度は、ベーター。ミクログロブリンに対する抗血液とは反応しなかった。

現在、125kDのhuTF軽額の意味は知られていない。それば、単一の、独立した分子種なので、ランダムなジスルフィド交換による、単層の際にアーティファクトとして誘導されたものでもないようだ。還元なしに、観和性による単離を行ったbuTFをSDSーPAGEにかけたとき、huTF活性は、58kDaと47kDaの分子量に対応するゲルから得出した。これら2つの分子量に対応するhuTF活性も、粗謹又は部分的に単離した胎盤の抽出物を、SDSゲルの建筑波動にかけたとき(データ示さず)も検出された。全ての場合において、その活性は、因子ではないことは、huTF特異的活性を示している。これらの知見は、huTFのみが因子でを活性化でき、かつ、軽額はこの機能に必要ないことを示している。

軽額がカェアを重複のおよそ半分のみにジスルフィド結合していることは興味深い。生体内で、カェアドの重要な領域に不在なのか、存在するのかとは別に、界面活性剤で分解される、非共有的相互作用を介して会合しているのであろう。軽額は、サイズが小さく、SDS-PAGEの際にマーカー色素の部分に体動してしまうため、また、カェアの報告されている分析例が運元後行なわれていることから、初期の研究では気づかれなかった。現行の規和性を用いた方法で早難することができる問題された量では、

成因子産物を提供するのに必要な組織因子:脂質比が、0.1%BSAを含むHBSパッファ溶液(20mMへペス、pH6.0、140mM NaC4、0.01%アジ化ナトリウム)中、種々の選度となるように、上述の得られた単離 huTFを溶かすことにより実験的に測定された。それから、種々huTF特积物を以下に述べるように再腐質化し、さらに、例2で報告されている募集校定法で測定された、最も高い活性を示す比が、後の使用のために 協図された。

トuTFの再開質化のための脂質は、MO州、セントルイス、シグマケミカル社から入手で含るウサギの脳アセトン抽出粉末から抽出することにより調製した。この粉末を、粉末1gに対し、25mをのヘブタン:ブタノール(2:1、v/v)の割でヘブタン:ブタノールと混合し、ついでこれに含まれる固体を焼結ガラスロートを用いた濾過により回収した。残留固体をロト・エバポレーションで乾燥し、クロロホルムに溶解後、-80でに保存した。必要なときに、そのクロロホルムに溶解した固体を資素質団気下で乾燥し、新しく調製した0.25%のデオキシコール設ナトリウム溶液中、4mg/mgとなるように溶解し、ウサギ環リン脂質溶液(PBPL)を作った。

再階質化には、各 h u T F 希釈物 I 0 0 μ d を、 I 0 0 μ d の R B P L 溶液、0.7 6 = 4 の 1 % ウン血清アルブミンを含む H B S 溶液 (H B S / B S A) 及び 4 0 μ d の 1 0 0 = M 塩化カド、ミウムと混合する。この混合物を 2 時間、3 7 にに複抄し、ついで、ここに含まれる h u T F 活性を、例 2 で述べた聚集検定法で変定した。

5. ハイブリドーマ及びモノグローナル抗体の作成

全てのハイブリドーマは、 5 ~ 8 週間の年令の、スクリプス・クリニック・アンド・リーサーチ・インスチチュート、動物飼育 場から入手できるメスのBalb/cマウス由来の解議細胞を用いて作成された。

a、マウスTF8の免疫化

例4で図製した観和性単離化 h u T F 5 マイクログラムを 100 μ g / u g となるよう生理食塩水に溶かし、M O 州ハミルトンのリピ・イム/ケム・リサーチ社から入平した R - 7 0 0 アジュバントと 1:1 の割合で混ぜ:エマルジョン化した。ついで、このエマルジョンをマウス T F 8 に皮下注射した。

最初の注射から、約4週間後、0.1m 4 生理女塩水中33 μg: の観和性単離化 h u T F を、0.1m 4 の完全フロイント・アジュバント (c F A) と混合し、エマルジョンを作り、これをマウスTF8 に腹腔内注射をした。

最初の接種から8週間後、リン酸緩衝食塩水中15μgの観和

ム・パイオケミカルズ)をイムロン・96穴フレキシブル・ビニルマイクロプレートのウェルに入れた。それからこのプレートを、1時間、37℃を維持し、1gGをウェルの壁に吸着させた。
TBSで3回洗浄した後、3分オバルミンを含む100glの
TBS/トリトンを各ウェルに入れ、過剰のタンパク質結合部位
をプロックした。

ウェルを、1時間、約20℃に維持したのち、そのブロッキング溶液を、アスピレータで除いた。そして、各ウェルに50μεのハイブリドーマ培養上清を加えた。できた固液相免疫反応混合物を1時間、37℃に維持した。その後ウェルをTBSで3回洗浄し、過剰の板は、アスピレータで除いた。

バックグランド放射活性 (huTFと抗体の反応無しの場合)はウェル当り、平均約200~300cpm であったが、一方、huTFと抗体の反応が有る場合は、ウェル当り10000cpm のカウントがある。抗huTP抗体の生産が正と検定されたハイブリドーマを選択し、本発明のハイブリドーマとした。つづいて、これらのハイブリドーマを、以下に述べるドット・ブロット検定でスクリーニングした。

b. ドット・ブロット・イライザ法

例 4 で調製した、アセトン沈霞したhuTFを、 4 : 1 (v/v)

平成 7.12.20 举行

性単離化huTFを静脈注射(1. v.)し、同じhuTF/ PBS接種を24時間後にも行った。そのマウスTF8の腕拍数 を融合のため3日後に採取した。

b. マウスTF9の免疫化

マウスTP9は、2回のリビ・アジュバント注射に、エマルジョン化的に変性したhuTPを用いること以外は、マウスTF8と同じ接種スケジュールがほどこされた。さらに、第1回目の PBS接種の腹腔内注射をCFA含有接種後4ケ月半後に行なった。

c. ハイブリドーマの作成

TF8及びTF9由来の脚細胞に、同じ融合操作を行った。各マウス由来の抑細胞約1×10°個を、30%ポリエチレングルコール(PEG4000、ATCC25322ー68-3)を含む200μ&の融合媒体中、2×10°のP3X63Ag8,653.1ミエローマ細胞と混合した。細胞融合後、生じたハイブリドーマを96穴プレートに植植し、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジン)中で培養し、つづいて、huTPと反応する抗体分子生産輸でスクリーニングした。

両マウスTF8及びTF9牌細胞由来の融合体共、HAT融合 媒体耐性ハイブリドーマ細胞クローンを生じた。TP8融合体は 907個のHAT耐性ハイブリドーマを、一方TF9融合体は、 348個のHAT耐性ハイブリドーマを生じた。

抗 h u T F 抗体分子の生産によるハイブリドーマのスクリーニング

a. 固相RIA

TBS中、20με/mをに希釈した100μεのヤギ抗マウス1mG(IN州、インデアナポリス、ペーリンガー・マンハイ

のアセトン:水溶液で抽出した。残存する沈設をTBS中に20 P8/alとなるように整備した。このhuTP溶液20 P8 (1 P4) を、構えないインクで、BA83ニトロセルロース紙 (シェレイチャー・アンド・シュエル、NH州、キーン)上に書 いた数字の隣にスポットする。スポットしたhuTPを空気乾燥 し、個々のスポットをパンチを用いて、ディスクに切り出す。個 々のディスクを、BLOTTO(ジョンソン(Johnson)等、ジェ ネッティック・アナリティカル・テクニック(Gene, Anal. fech.) 1巻、3頁(1984年))を含む、多次トレイの個々のウェル に使し、約1時間、37℃に維持した。

この日LOTTOを、ウェルからアスピレータで飲き、各ウェルに、200月2のハイブリドーマ培養上清を加えた。さらにこのウェルを2時間、37℃に保ち、その後、このペーパーディスクを、TBSで2回洗浄し、ウェルから取り出し、TBSにより、さらに洗浄するため、1つの大きな容器に入れた。ついで、過剰の液体をその容器から除去する。

プロトブロット状類キットの(MI州、アン・アーバー、プロ メガバイオテク社)アルカリホスファターゼ結合抗マウス 1 g C を、BLOTTOで 5 7 0 0 倍に希収し、このペーパーディスク と使触させた。このプロトブロット溶液との接触を、3 7 でで 3 0 分間保った。その後、ペーパーディスクを、TBS中で3回 洗浄した。桀者の指示に従い、プロトブロットキット中に含まれ ている発色物質により、ディスク上に結合したアルカリホスファ クーゼが検出される。

c . ウェスタン・ブロット検定法

ウェスタン・プロット検定のため、例4で報告したように単離 した約10μgのhuTFをサンプルパッファ(2%SDS、

5 OaMジチオスレイトール、1 O Xグリセリン) に溶かし、5 . 分間、煮沸した。それから、これを、レムリ (Laonn)))により報 告された (ネイチャー (Mature) 、 2 2 6 巻、 6 8 0 頁 (1970 年))、参考としてここに組込まれている、予め染色された分子 量根準の小さい両側のレーンの間の広いレーンに試料をロードす る、分取型のスラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲ ル世気泳動にかけた(分子量爆準:MA州、ニュートンセンター、· ディパーシファアイド・パイオテク社)。 参考としてここに組込 まれている、トウピン(Towbin)等(プロシーディング・イン・ナ ショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sic.) USA. 7 6 巻、4.3 5 0 頁(1 9 7 9))により報告されて いるように、電気泳動及びニトロセルロースへの電気ブロッティ ング後、このブロットを、TBS中の5%脱脂粉乳溶液でブロッ クレ、マニホルドに固定した(M人州、ケンブリッジ、イムネチ クス社、ミニブロッタ)。 8 暦のハイブリドーマ和胞培養上演の ストックを、各マニホルドスロットにロードし、37℃で1時間 インキュペートした後、このブロットを取り除き、TBSで修浄 した(0.02%アジ化ナトリウム合有TBS)。抗体が結合した レーンを、発色物質で発色させたアルカリホスファターゼを結合 した第2抗体を用い、供給業者の推める方法に従って可提化した (WI州、マジソン、プロメガパオテク、プロトブロット) 。陽 性のストック由来の培養上清を、5%脱脂粉乳TBSによる8倍 **希釈物について、別個に再テストし、抗TF抗体を生産する個々** のハイブリドーマクローンの両定を行った。

抗トロTF抗体産生が正と判断されたハイブリドーマをさらに 特徴づけるために選択した。例えば、上記のTF 8 融合体由来の ハイブリドーマは、例 6 bで述べられているドット・ブロット検

5 C S モノクローナル抗体 1 O mgの透析により、活性化した。活性化したTP 8 - 5 C S を、 2 m 4 のアフィゲルー 1 O アガロースピーズ (パイオラド) と混合し、できたカップリング反応混合物を、製造業者の指示に従がい処理して、TP 8 - 5 C S / アガロース固体サポートを作った。

それから、例3で報告したように、固体サポート上の過剰のタンパク質結合部位をプロックし、洗浄後、減圧超過して、TFB-5G9/アガロースケーキを作った。

9. huTFの免疫競和性による単離

ヒトの脳のおよそ半分、すなわち約100maに等しい、例1で調製した脳油出溶液を、計64のパッファAに対し、2回の外液交換をしつつ、4でで3日間透析した。その透析した抽出物を1.5時間、10,000×mで違心した。できた上清を、例4で調製したグリシンエチルエステルーアガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら、2時間窒温に維持したのち、その個相と液相を連結がラスロートによる鑑過で分割した。そのhuTP含有液相を回収し、例8で調製したTP8-5C9/フガロースケーキと混合し、同/液相免疫反応混合物を作った。

上述の洗浄後、ぞの団体サポートに免疫学的に結合している huTF、その固体サポートを、焼詰ガラスロート上に保持した 足法及び別6cで述べられているウェスタンプロット検定法で
h u T P との免疫反応を、そのハイブリドーマ培養上情が示すな
らば、抗huTF抗体塵生ハイブリドーマ培養上情が示すな
らば、抗huTF抗体塵生ハイブリドーマ培養と特徴づけられる。こ
れらの特徴は、24個のT P 9 ハイブリドーマ和勘済列について
みられ、そのほとんどは、例13の第5要に示した。その他のス
クリーニング法で選択したハイブリドーマにより度生される抗体
分子は口解細胞を独自の融合体に提供する免疫化マウス(イブリドーマ和胞が単離される、96六倍要プレート、列番号及びウェル
番号を示す文字によって呼ばれる(すなわち、587、11D
12、その他)。特殊な意味の文字は、1節、ハイフン勝又は2
踏として、ここにリストされる。例えば次の文字は同じモノクローナル抗体分子組成を意味している;T P 8 - 5 G 9、T P 8 - 5 G 9及びT P 8 - 5 G 9。

7. イムノグロプリン laCの単離

イムノグロブリン I g G は、製造業者の指示に従がい、パイオラドラボラトリーズ M A P S B システムを用い、マウスのハイブリドーマ和助系列 T P 8 - 5 G 9 (A T C C 第 H B 9 3 8 2 号)を含むマウスの酸水液から単離される。単雄した I g G のタンパク受濃度は、製造業者の説明書に従がい、B C A タンパク質検定は類(ピアスケミカル社)を用いて測定した。

8. huTPの免疫観和性による単態のための、抗ねuTP含有 関係サポートの調質

抗 h u T P 抗体を、アガロース固体マトリックスへカップリングするため、少なくとも 1 回透析液交換を行う、 0.1 M M E S、pH 6.5 を含む 5 0 0 m 4 の透析パッファに対する、 4 c、 1 6 時間の、例 7 で報告したように掲製した、MAP S 単類 T P 8 −

まま、D. I Mグリシン、 pH 2 5 及び 1 96 トリトンX - 1 0 0 溶液 2 0 m 4 で洗浄することにより、開放 (溶出) した。それから、例 4 に会て述べたように、溶出物質を回収し、 h u T F 検定を行ない、集めて透析した。

送析物を 4 倍容の冷アセトンと混合し、 h u T P タンパク質を 比較化した。さらにこの沈殿をおよそ - 1 0 で、5,000×5、 3 0 分の遠心で築めた。生成したペレットを夏素雰囲気下で乾燥 し、そのペレットの一部を変性条件でのSDS-ポリアクリルア ミドゲル電気氷動で分析した(SDS-PAGE)。

第8図に示したこの分析結果は、huTFが免疫現和性により、 脱脂語切末1グラム当り、33mgのhuTFの収率で単離される ことを示している。

10. 抗トロTF抗体による凝集の阻害

10月10ハイブリドーマ培養上清を、例4で調製した約2ng の再脂質化トuTFを含む90月10円BS/BS人と混合した。 このようにして作った免疫反応混合物を30分間37でに保ち、 抗トuTF抗体分子を免疫学的にトuTFに結合させ、免疫反応 強物を形成させた。つづいて、この免疫反応混合物について、例 2で述べたように、トuTFのプロコアグラント活性を検定した。 オガティブ・コントロールとして、無関係の1gC調製物を沈 トuTF抗体の代りに用いた。

幼果的 h u T F 湿度は、インヒビクーの存在下測定した凝血時間を用い、例 2 のように作った模準曲線から外持した。阻害は、用いた実際の h u T F 湿度について、効果的 h u T F 湿度の比率として表わされる。少なくとも5 0 パーセントの阻害をするモノクローナル原件分子偶器物は、本発明の旅体分子成分を中和するものとして退収された。

倒るに述べたように、単離したhuTFに対して生じたハイブ リドーマ由来の数多い培養上滑を、凝集開始を阻害する能力につ いて、先の操作により測定した。有意に凝集を阻害することが分 ニたハイブリドーマを、知ら豊に示した。

また、抗 h u T F 抗体による磁集阻害は、予め形成されたhoff - 因子物複合体を用いて行った。例4で調製した再脂質化した huTFlngest10416. HBS/BSAT044.20 ■M塩化カルシウム10μ 4及び、例3で述べられているように 調製した因子約25mgを含む10μgと混合する。この混合物を ・15分間37℃に保ち、huTFを、混合物として俊える因子を と複合体をつくらせる。その後、10ggの溶液に、例7で述べ たように調製したMAPS-単離化モノクローナル抗体的10mg を混合し、この第2の混合物を、30分間37℃に保った。 さら に、第1に20mM塩化カルシウム100ggついで、ヒトのク エン酸化血法又は例12で送べてように調製した因子は欠損血器 を加え、ついで砂で変わされた凝血時間を観測することにより、 生成した混合物の凝集阻害の測定を行った。例10で述べられて いるように、阻害率を表わし、予め形成したhuTF-因子関復 合体での阻害の結果を、第6 m 表に示した。

第 5 表

抗huTPによるhuTF-因子が依存の凝集阻害

1. クエン酸化ヒト血漿による凝集 .

抗体	因子似。	. 阻害率
プランク*	+ .	٥
TT8569'	+	5 8 %
コントロール・	+	. 0
TF85G9	<u> </u>	8 3. %

複合体により開始する破無を阻害する能力を有意にもつと考えた。 Choomoabil, TF9-1B8, TF9-5B7, TP 8-5C4、TF8-11D12、及びTP8-21F2がある。 11. ポリペプチド合成

ここで使用されている種々のカロTPh領域に対応するボリベ プチドをハゲンメイヤー(Hagensalar)等(ポップーセイラーズ (Moppe-Seyler's) で、フィジオロジカル・ケミストリー、353 地、1973頁(1982年)) のシンメトリカル・アンハイド ライド法を用いたアプライド・パイオンステムズモデル430A ペプチド合成級で化学合成した。第1及び第2表のポリペプチド に加え、以下に示す第3喪のポリペプチドも合成し、これには、 huTFhと反応できる抗ポリペプチド抗体の生産に有用な、本 発明のポリベブチドが含まれている。

第 3 表

・ 抗原性ポリペプチド

p121-155 H-TKVNVTVIDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTL-OH P204-226 H-DSPVECMGQEKGEFREIFYIIGA-OH

p225-244 H-GAVVIVVIILVIILAISLHK-OH

P245-263 H-CRKAGVGQSWKENSPLNVS-OH

12. ポリペプチドによる凝集阻害

huTP法存の職業開始を疎開する、本発明のポリペプチドの 能力を、まず、このポリペプチドを因子な/VEコ及びカルシウム イオン存在下でインキュペーションし、さらにこの混合物を、因 子雅ノ軍ョ久援血張に加えて、凝血時間を見積った。

ヒトの因子リノVIコを例3に述べた方法で草葉した。HBSノ BSAma 4 当り、この単離した因子VI / VI 2 0 0 n g の溶液 1 0 # 2に、100 # 2 HBS、20 # 2 2 5 mM CaC 2 . 及び100 II. 因子VIテプリート化ヒト血器

コントロール

抗体	因子呀	阻害率
プランク	+	.0
T F 8 5 G 9	. +	5 8 %
コントロール	+	0

- a. プランク とは、モノクローナル抗体を検定法で用いなか ったことを示している。
- b. *TP85G9 *とは、ハイブリドーマTF8-569から 単離したモノクローナル抗体を検定で用いたことを示している。
- c. "コントロール"とは、検定で無関係なモノクローナル抗体 を用いたことを示している。
- d. *+*は、抗体を混合物に加える前、因子でを加え、精製し たhuTFと複合体を形成させることを示す。

抗huTF抗体による凝集国害の別の研究が、TFを因子な! Viaと会合させ、TP:因子VI/Via複合体を形成させる前後の 開客を比較する条件下で行った。

これらの研究で、予め形成したTP:WI/Wia複合体を用いた 抗huTFh抗体による凝集阻害を、利用するモノクローナル抗 体合有溶液10μまにMAPS単離化モノクローナル抗体合有溶 液の代りに、ハイブリドーマ培養上浦を用いた以外、例10で述 べたのと基本的に同様に行った。比較のため、抗トロTF抗体に よる凝集阻害を、例10で述べたように、因子な/wsを含むク エン酸化血漿との混合の前、それら抗体及び再踏質化トロTFの 免疫担合体を形成することにより検定した。

ここで述べている全ての流体は、この比較阻害検定試験を行った たが、約60%以上の孤客を示すものだけが、huTP:W/We・

µ L の合成ポリペプチド含有TBS/トリトンを加えた。様々の 護皮で含まれる多種の混合物をこのように調製し、それを、15 分間、37℃に維持した。例もで述べたように頻繁した再覧質化 した組織因子を、HBS/8SAで格収し、例2で述べたような 森集検定法でテストしたとき、10gまでおよそ45秒の凝集時 間が得られるように繊製した。上記のように維持した漢合物をさ らに、再胎質化huTF10#8格釈物、25mMCaC##100 μ A 及び 1 容の血器に対し1.5 容のHBSで希釈した因子は/Via 欠損血器 1 0 0 μ g (KA州、オーバーランド・パーク、ジョー ジ・キング・パイオメティカル社)と混合した。凝血時間の延長 は、この合成ポリペプチドによる凝集の阻害を示していることに なる。阻害率を、例10で述べているように計算した。少なくと も30%の破集阻害を示すポリペプチドはhuTFh結合節位ボ リペプチド類似物、すなわち:第4支のセクションIで示されて いるポリペプチド、p26-49、p146-107及びp161 -189である。

別に、上記阻害検定において、モノクローナル抗体による免疫 親和性吸者により、因子WI/WI=欠損血漿である因子WI/WI=欠 損血漿を用いた。ヒトの因子などはつに対するモノクローナル抗 体を、例3で述べたように単離した因子VI/VI aをhuTFの代 りに免疫原として用いた以外、例5で述べたものと基本的に同様 に調製した。できたハイブリドーマを、イライザ法で評価し、 IN州、サウスペンド、エンザイム・リサーチ・ラポラトリーズ . 社から入手できるヒトの血液タンパク質、タンパク質S、因子は、 因子X及び因子目と反応しないハイブリドーマを同定した。その ようなハイブリドーマ、FV11、F1、2H3-32は、T.S. . エジントン(Edgington) 博士から載いた (CA州、ラジョラ・

スクリプス・クリニック・アンド・リサーチ・ファンデーション社)。イムノグロブリンI & G を、ハイブリドーマF V I I 、F I、2 H 3 - 3.2 を含むマウスの版水から単駆し、この単離したI & G を、例 8 に述べたように、固体サポートに結合させた。できた抗因子以 / VI a モノクローナル抗体含有固体サポートを貯留した正常なクエン酸化血量から、血糖含有被相を収積し、保留すること以外、例 9 で述べた免疫観和性操作を用いて、因子 VI / VI a を除くのに用いた。

脂質化型で用いたとき、競合的に凝集を阻害する、いくつかのポリペプチドの能力を、100μ g の合成ポリペプチド溶版の代 りに、100μ g の脂質化合成ポリペプチドを用いることにより 上紀検定法での評価を行った。

期質化合成ペプチドは、合成ポリペプチドを、単離したhatPの代りに用いること以外は、単離したhuTFの再取質化で用いた、例4で述べた方法で調製した。ルーチンには難質とポリペプチドの比は52:1(w/w)が用いられた。少なくとも30%の磁集阻害を起こす脂質化ポリペプチドが、脂質化型で存在するとき、huTP結合部位ポリペプチド週(物すなわち、第4表のセクションIIで示されたポリペプチドと考えた。

第 4 表

トロTFトのボリベプチド類似物の トロTFによる軽集開始の阻害

ペプチド	阻害	٠
1. 非リン脂質化ペプ	≠ r	進 度
p 1 - 3 0	2 5. 0	10 u M
p 2 6 - 4 9	8 8. 8	10 u M
p41-71 ·	25.0	10 v M

t.

5 0 μ 4 のハイブリドーマ培養上滑を各ウェルに入れ、1時間 3 7 でに栽持した。さらにこのウェルをTBSで3回洗剤し、過剰の液体をアスピレータで除いた。

単離化huTPは、例 9 で述べたように、免疫規和性カラムで

切裂した。単離化huTPを含むアセトン比較をTBS/トリト

ンに溶かし、そのタンパク質構度を、製造業者の説明書に従がい、
BCAタンパク質検定は取(ピアス)を用いて測定した。huTF

の炭化水素便賃を、オシャネシー(0'shannessy) 等の報告した

方法(イムノロジカル・レターズ(lannuol. Leiters)。8 巻、
2 73~227頁(1984年))に従がい、ピオチンーヒドラ

ジド(NY州、プレインピュー、1CNパイオメディカル社)を
用いて、ピオチン化し、ピオチン化huTP溶液を作った。

TBS/トリトン中60ng/mlに課題した50μlのヒオチン化huTP溶液を、5μM合成ポリペプチドとともに、各ウェルに入れ、1時間、37℃に維持した。その後、このウェルをTBS/トリトンで3回洗浄した。

5 mM BDTA、0.5 %トリトンX-100及び1%BSAを含むTBSで1/100に稀釈した、100μ4のストレプトアビジン-結合アルカリホスファターゼ (NY州、ニューヨーク、エンゾバイオケム社、デテク!-mik)を各ウェルに入れ、30分間、37 にに維持した。その後、このウェルを、10mMリン設カリウム (pB6.5)、2%BSA、0.5%トリトンX-100、0.5 M塩化ナトリウム及び1mM EDTAを含む溶液を4回洗い、ついで検出バッファ (0.1 Mトリス・塩酸 (pB8.8)、0.1 MRaC4、5 mM MaC4。)で1度洗った。

その後、検出パッファ中、2mMのp-ニトロフェニルリン酸

		平成	7. 12. 2 0	発行
	p 4 0 - 4 9	2 5. 0	10 u M	
	p 5 6 - 7 1	2 5. 0	10 u M	
	p72-104	25.0	10 u M	•
	p 9,4 - 1 2 3	2 6. 0	. 10 u M	
	p 1 2 1 - 1 5 5	10.0	10 a M	
	P 1 4 6 - 1 6 7	8 7. 5	1 6 u M	
	p 1 6 1 - 1 8 9	3 2. 5	. 10 u M	•
	p 1 9 0 - 2 0 9	2 0. 0	10 u M	•
•	p 2 0 4 - 2 2 6	2 0. 0	I 0 u M	
•	なし	0		
١.	リン脳質化ペプチ	F		
	P 1 - 3 0	8 1. 0	10 u M	
	p 2 6 - 4 0	8 3. 0	10 u M	•
	P 4 0 - 7 I	6 5. 0	1 0·u M	
	p 5 0 - 7 1	7 3. 3	3 0 u M	
	p 9 4 - 1 2 3	9 3.7	10 u M	
	p 1 2 1 - 1 5 5	5 5. 0	10 u M	
	p 1 4 6 - 1 6 7	B 0. 0	10 u M	
	p 1 6 1 - 1 8 9	9 4. 0	10 u M	

a. 例12で述べたように測定した阻害率

上記のポリペプチド風客研究で得られた代要的投与一応答曲線 を第9及び第10回に示した。

13. ポリペプチドによる抗体-huTF免疫反応の阻害

フレキシブルピニルでできたイムロンU座96次プレート(ダィナテク社)のウェルを過剰タンパク質結合部位のブロッキングを、37m20分間行うこと以外、例6で述べた方法でヤギ抗マウス 1 a G (ペーリンガーマンハイム社)によりコーティングし

を含む溶液 100 μ 8 を各ウェルに加え、1 時間 3 7 でに接持する。ついで、405 ナノメーターでの光学密度を各ウェルについて、パイオ・テク・マイクロプレートリーダー (V T 州、ウィノースキ、バイオ・テク・インスツルメント)を用いて測定した。この競合的阻害研究の結果を第5 支に示した。

赛 5 赛

モノクローナル抗体とペプチドの相互作用の表

		_	, ne n		, ,	W 14 5	L 1774	~~	
Kad*	pi p26 -30 -49	-71		6 p72 1 -104	₽94 -123	p121 -155	p146 -167	p161 -189	₽190 -209
TF85G9	+								٠.
TF81101	2 +								
TF85C4	•				+	•		•	•
TF821F2				•					
TF91D5			1	•	+		+		
1F92C4		•			+			`.	
1F92F6				•				+	
1F95C7		+			•		+	٠.	
TF96B4			•				. +		
TP 99 C3		٠,	•		•		+		
_TF910C2			+				ŧ		
TP91F1	. +								
TF91E7		•		+			•		•
179188		+					•	ŧ	
7F91B9	♦.	٠.							
TF94D11	. +	1							
179564	•	-	· · •						
1F95B7 .	.+. +								
1F96G4	•		•						•

- a. 各モノクローナル抗体 (Hob)は、同名のハイブリドーマにより産生された。全てのハイブリドーマは例13で述べたように、ハイブリドーマ培養物上演を用いてスクリーニングした。
- b. これらの抗体は、例10の結果から中和性をもたないと考えた;その他の全ての抗体は、同結果に従がい中和性をもつと考えた。

もし、ポリペプチド存在下で得られた吸光度測定値が、ポリペ プチド存存在下で与えられた抗体に対して得られた平均値値から 1以上の領準偶差をもつとき、題客が有意に起ったと考えた。

14.2部位イライザ法による身体サンプルにおける h u T F 校 出

車波、血漿、鳴液、尿、その他の身体サンプル中のhuTFは、同じhuTF分子に同時に結合することができる2つのモノクローナル抗体を用いて検出できる。

イムロン・ポリスチレンU度96穴プレートを、まず、各ウェルに、TBS中10μ8/m2に密釈した1gG·100μ2を入れ、ついで、ウェルと、1gG溶液との接触を、4で、一晩維持することにより、ヤギ抗マウス1gG(ベーリンガーマンハイム社)でコートした。そのウェルを、TBSで3回洗浄し、ついで、

がキュアドに同時に結合できる能力をもつ限り、いろいろ変えることができる。例えば、第1抗体として、アア9-6日もを用いたとき、アア9-11日12を、アア9-10H10の代りに、第2の抗体として用いることができる。このように、本発明は、本検定法で同時に結合できる種々の抗体の組合せを考案した。

15.全プレトuTFカコード配列を含むDNA断片の構築 全プレトuTFコード配列を含むDNA断片を第11回にその 制限地図に示されている、組換えプラスミドゥCTF64、pCTP 403及びゥCTF314と、この分野でよく知られている操作 を用いて構築することができる。例えば、マニアチス(Hanistis) 等、NY州、コールドスプリングハーバー、モレキュラー・ラボ ラトリー、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニン

グ (1983年) 参照。

第11図で示されている組換えDNAプラスミド中に含まれる 挿入断片は、クローニングを可能にする、各末端のEcoR I リンカー 5′-GGAATTCC-3′(MA州、レキシントン、コラボラチブリサーチ社)を有している。これらのリンカー配列は、天然のト u TPト DNAコード配列の一部ではないので、第2図に示されるヌクレオチド配列中には存在しない。組換えDNA分子提奨の説明は、関係するト u TFト DNA配列についても明らかなように、BcoR l 末端を含む消化により生じ、これらの付加的なリンカー配列を含む断片は、第2図で示したヌクレオチド塩基香号によって示されるだろう。この断片は、その末端にこれら付加的配列を含むことが理解できよう。

プラスミド p C T F 6 4 を、制限エンドスクレアーゼ E coR I 及び D ra A で消化し、第2 図で示される、塩器残器 1 ~ 2 9 6 番 に対応するヌクレオチド配列を含む D N A 断片を作った。このよ 各ウェルに、3%BS人を含むTBS/トリトン100μ & を加 えた。その後、これらのウェルを1時間、37℃に維持してから、 TBSで3回抗浄し、さらに、遇到の液体をアスピレータで除い た。

第1のハイブリドーマ、TF9-6B4由来の抗トッTP抗体 分子含有培養上滑100μ4を各ウェルに入れ、1時間37でに 維持した。それから、これらのウェルをTBSで3回洗浄し、つ いで過剰の液体を、アスピレータで除いた。

例3で閲製したように、免疫観和性単解し、アセトン比較化 huTFを、TBS/トリトンに溶した。このhuTF溶液の特 表物をTBS/トリトンで5μg/agから0.5ng/agの範囲 で調製し、希釈液100μgをイムロンプレートのウェルに入れ た。このhuTF希釈液を、第1の抗体と接触させ、1時間37 でに建神した。さらにこの希釈物をウェルから除き、ウェルを TBS/トリトンで3回洗浄した。通剰の液体をアスピレータで 除いた。

抗huTF抗体を、例でで述べた方法により、第2のハイブリドーマTF3-10H10の酸水からMAPSで早離した。この抗体溶板のタンパク質を測定し、ついて、例13で述べたようにピオチン化によりラベル化した。

このビオチン化した抗トロヤド抗体をTBS/トリトンで50 ns/sを任務収し、この溶液100μを各ウェルに入れた。 そのウェルを1時間、37℃に維持し、ついでTBS/トリトンで3回流った。

この結合した、ピオテン化抗 h u T P 抗体を、例 1 3 で述べた デテク 1 - alk システムを用いて検出した。この検定法で第 1 及 び第 2 の抗体として用いているモノクローナル抗体は、その 2 つ

うにして作った、302ヌクレオチド塩基対 (bp) 断片をアガロ ースゲルを用いたサイズ分面により具雕し、アルカリホスファタ ーゼを用いた処理により脱リン酸化した。

プラスミドpCTP403を制限エンドスクレアーゼEcoRlで補化し、第2図の残器778~1125番に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。生成した352bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分面により単疑した。

プラスミド p C T P 3 1 4を、制限エンドスクレアーゼ EcoRIで消化し、生成した 6 4 7 bpの断片をサイズ分画で単離した。この断片は、第2 図の残器 1 3 5 ~ 7 7 5 番の配列に対応するスクレオチド配列を含んでいる。 6 4 7 bp断片をサイズ分画で早離し、アルカリホスファターゼで限リン酸化した。

この352bp断片及び脱りン酸化した647bp断片をT4DMA リガーゼの反応によって機能的に結合(ライゲーション)し、第 2図の残酷135~1125番に対応するスクレオチド配列を有 する999bpの断片を作った。

さらに、この999bp断片を、割限エンドスクレアーゼ Dra TT で消化し、第2図の残益296と297者の間でこの999bb断片を切断し、これによって、168bpと831bpの断片が生ずる。 さらに 放り ン酸化した302bpの断片と、831bp の断片を T4DNAリガーゼで機能的に結合し、第2図の1~1125替に対応するスクレオチド配列を含む1125bp断片を作った。

EcoRIで消化して、クローニングプラスをドベクター p U C 8 を線状にした。先に調製した 1 1 3 3 bp断片と、EcoR I 消化 したベクターをT 4 D N A J ガーゼで機能的に結合して環状組換 えD N A 分子 p U C - プレ h u T P h を作った。

大្関限RRI株(MD州、ゲイサーズパーグ、ベセスダ・リサ

平成 7.12.20 発行

ーチラボラトリーズ)を p U C - ブレト u T P h でトランスホーム し、そしてアンピジリン 財性に 基づいて、トランスホーマントを選択した。それから、この選択したトランスホーマントを p ローン化し、プレト u T P h 構造遺伝子をもつ組換え D N A 分子の存在によりスクリーニングした。

プレトuTFト構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によるスクリーニングは、各選択されたトランスホーマント由来のrDNAをBcoRIで消化することによって行った。生じたBcoRI断片をアガロースゲルでサイズに従って分解した。352 bp、181bp及び2682bpのDNA断片に対応する三つのパンドパターンを示す組換えDNA分子でプレトuTPト構造遺伝子の存在を確めた。上述のBcoRI消化パターンを生ずるrDNAを有する大陽関RRIトランスホーマントは、本発明の組換えDNA分子を含み、かつ、消収され(回収)された。

和腔外アンカー領域を含むが、カルボキシル末端にトランスメンプレン・アンカー領域を欠く、プレカロTPカコード配列の実質的領域を含み、従って、可溶性カロTPカタンパク質をコードするDNA断片を次のように構築した。

プラスミドPCTP64を制限エンドスクレアーゼ EcoRIで 消化し、第2回の1~486香の残茎に対応するスクレオチド配 列を含むDNA断片を作った。このようにしてきた486bpの断 片を、アガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し、その後、ア ルカリホスファターゼ処理で説リン酸化した。つぎに、このよう に似リン酸化した486bpの断片を制限エンドスクレアーゼ Dra 回を用いで消化し、第2回の296番と297番の間の部位で、 486bp断片を切断し、296bp及び190bpの断片とした。こ の296bpの跛片を打切ースゲルのサイズ分画で単離した。

(1983年)) の方法に従がい、互いにオリゴヌクレオチドが 機能的に結合するのを防ぐため、ポリヌクレオチドキナーゼによ りリン酸化を行なわれなかったこと以外は同様にして、

> 5 ' - AATTTAGAGAATAAGAATTCGGG - 3 ', AU 3 ' - ATCTCTTATTCTTAAGCCC - 5

の配列をもつ、合成オリゴヌクレオチドフダブター断片を作った。このオリゴヌクレオチドをアニールし、粘着 EcoR 1 末端を含む二本譲DNAリンカー断片を作り、ローザースタイン(Rother-stein)の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジー(Hotheds in Enzymol.)、6 B 巻、9 8 頁(1 9 7 9 年))に従って、平滑末端とした。つぎに、このリンカー断片を、p U C ープレト・7 P h ー Tから得た 7 7 5 bp断片に凝縮的に結合し、7 7 5 bp断片の各末端に1つのアニール断片を含む 8 1 7 bp断片を作った。その後、この8 1 7 b p 断片を足coR 1 で消化し、8 1 7 bp 断片の各末摘を平滑から B coR 1 粘着末端へと転換し、8 0 5 bp 断片とした。この8 0 5 bp 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単離した。

クローニングプラスミドベクターp U C I 8をEco R I で消化 し課状化した。先に調整した 8 0 5 bp断片とEco R I 消化したベクターをT 4 D N A リカーゼを用いて機能的に結合し、環状組換 ま D N A 分子 p U C ープレト u T P h ー T R とした。

大陽曹RRIをpUCープレカαTPカーTRでトランスホームし、pUCープレカαTPカーTRを含むクローンである、アンビシリン耐性トランスホーマントを退択した。

16. 組換えカロTFトコード配列の発現に反わロTFトの生産 組換えDNA分子由来の組換えカロTFトの発現は原体性細胞 細胞、非常機具体性細胞及びより高等な(脊機)具体性細胞を含 プラスミドゥCTF314を削限エンドヌクレアーゼEcoR Iで消化し、第2回の135~715番の残益に対応するヌクレオチド配列を含むDNA断片を作った。この541bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で卑離し、ついで、アルカリホスファク・ゼ処理により設リン酸化した。この設リン酸化した641bp断片を、Drs可で消化し、第2回の296番及び297番の動の部位で、この641bp断片を切断し、これにより、162bp及び479bp断片とした。このうち、479bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画により卑難した。

上述のように調製した29 5 bp及び479 bpの断片を、T4DNAリガーゼを用いた反応により機能的に結合(ライゲーション)し、第2図の1番から775番の配列に対応するスクレオチドアダプター配列を有する775 bp断片を作った。

クローニングプラスミドベクターpUC18をBcoRIによる 情化で抜状化する。上記のように顕製した175bp 断片と、 BcoRI補化ベクターをT4DNAリガーゼで機能的に結合し、 強状組織よDNA分子pUC-プレカuTFh-Tを作った。

大陽面RRIを、pUC-プレトロアドル-Tでトランスホームし、pUC-プレトロTドト-Tを含むクローンであるアンピンリン耐性トランスホーマントを選択した。

超換えDNA分子pUC-プレhuTFh-TをBcoRIで精 化し、生成した775bp断片をサイズ分画で単離した。

カルーザース(Caruthers) 等(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティー(J. Am. Chem. Soc.)、103 色、3185頁(1981年))及びゲイト(Gait)等(コールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム・クオント・バイオロジー(Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.)47巻、393

む種々の発現媒体中で行うことができる。そのような発現媒体の 代表例には、各々、大語菌S、セレビシアエ(cerevisiae)及び チャイニーズハムスター卵巣(CHO) 細胞がある。

a. 大騎軍におけるプレカロTFカの発現

大場図において、プレトuTF h 構造遺伝子を発現できる退換 えDNA分子は、例15で作ったpUC-プレトuTF h 超換え DNA分子由来のプレトuTP h 遺伝子合有 DNA 断片を単離し、 ついで、この断片を原核性発現ベクターに機能的に結合すること により構築することができる。

組換えDNA分子pUC-ブレトuTPhを、そのブラスミド中に存在する Bco R I 部位を部分的に切断するような条件で、Bco R I 消化する。この部分消化法は、アニアチス(Haniells) 等、NY州、コールドスプリング・ハーパー、コールドスプリングハーパー・ラボラトリーズ、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニングにより詳細に報告されている。図2の改善し番から、1125番で示される配列に対応するヌクレオチド配列を含む1133bp断片を、サイズ分属によりBco R I 部分分解度物から単類した。

原は性発現ベクター p K K 2 2 3 - 3 (N J 州、ビスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社)を、Eco R I による消化で線状化した。この消化ベクター及び 1 1 3 3 bp プレト u T F h 構造遺伝子含有断片をT 4 D N A リガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換え D N A 分子 p K K - プレト u T F hを作った。

大幅関RRIをpKKープレトロTFかでトランスホームし、 pKKープレトロTFか含有クローンとしてアンビシリン射性トランスホーマントを選択した。

7. 12. 20

b. 大路雷におけるhuTFhの発現 大路面においてカルTP遺伝子を発現することができる疑問え DNA分子は、例16mで調製した1133bp断片を退作して様 袋した。まずこの断片をアルカリネスファターゼで放りン酸化し、 ついで、制限エンドヌクレアーゼBbvlで消化した。生じた964 パク智を従来の技術を用いて収録した。 bpの断片は、第2図の残器164~1125番に対応するヌクレ c. CHO相応におけるプレカロプアカの発現

先に述べたように、

K'-AATTGACATGTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATT-1'. .

オチド配列を含んでおり、サイズ分面により単謀した。

3'-CTGTACAGTCCGTGATGTTTATGACACCGTCGTATATTAAATTG-5', の配列をもつ合成オリゴスクレオチドアダプター断片を作り、ロ ザーステイン (Rotherstein)等 (メソッズ・イン・エンザイモ ロジー(Hethods in Enzymol.) 68巻、98頁 (1979年)) の方法に従って、粘着BcoRl及びBbvl末端を含む二本額・DNA リンカー断片をアニーリングすることにより作った。このリンカ ーをまず9648の 断片に機能的に結合して、10088の 断と した。ついで、108888 新片を、TIDNAリガーゼを用い、 EcoRI補化したベクター pKK223-3と機能的に結合し、 環状組換えDNA分子 pKK-huTFhを作った。

組換えDNA分子。KK-huTPbは、pKK-プレ buTPb と、(1)残器1~128番の残器がない、及び(2)新しいメチオニン コドンが、残基130番の前に綱能的に結合しており、その結果 タンパク営発現(翻訳)が挿入されたメチオニンコドンの場所で 始立ることだけが異なる。

組換えDNA分子 pK KープレカuTFト及びpKX - hutfl を、その中に会会れる構造遺伝子によりコードされるカロTPh

た。それからこの選択したトランスホーマントをクローン化し、 モノクローナル抗体TF8-5G9を用いて、発現するプレ huTFhタンパク質の存在を各クローンについて検定して、 pSVープレカuTFカの存在に関する選択を行った。 d. CHO細胞におけるhaTFhの発現

水乳類細胞において、 h u T F h を発現することができる組換 えDNA分子を、例16c由来の pSV-プレカuTPhを、約 展エンドヌクレアーゼ B gl I で消化することにより構築した。生 成した1153bp 断片をサイズ分面で単離し、つづいて、劇器 エンドスクレアーゼ Boviで視化した。生じた974bp 断片は、 図2の残差164~1125番の配列に対応するスクレオチドア ダプター配列を含み、これを、サイズ分面により単疑した。 先に述べた方法で、

5'-GATCGACATGTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATT-3', 及び

3'-CTGTACAGTCCGTGATGTTTATGACACCGTCGTATATTAAATTG-5', の配列をもつ各成オリゴヌクレオチドアグプター断片を合成し、 フニールして、 右着性 Ball 及び Bbv l 未消を含む二本頃 D N A リンカー断片を作った。ついで、このリンカーをTiDNAリガ ーゼを用いて974bg 断片に機能的に結合して、第2図の残器 130~1125番の残茎の配列に対応するヌグレオチド配列を 会む、1018bp 断片を作った。

プラスミド発現ペクター pKSV-10を、Ba!0で消化して 親状とし、ついで、TIDNAリガーゼを用いて、1018bp 断片に機能的に結合し、環状組換え DNA分子 pSV-huTFh を作った。

組換えDNA分子 pS VープレカロTPh及び pS V-hutfh

又はプレトリTFトの発用に組合する重体性治主性体に導入した。 そのような恵主媒体の代表例は、大脳面RR1様である。この復 主を、組換えDNA分子でトランスホームし、細胞増殖とこの延 換えDNAの発現に適合する条件下で培養し、この発現したタン[・]

脊椎動物超距中、プレトップを力速伝子を発現できる超換え DNA分子を例16aで頻製した1133bp 断片を用いて構築

カルーザース (Carethera)等及びゲイト (Gait) 等の方法 (上記)を用い、

5 ' - AATTCCCGGG - 3 ', RU

5'-GATCCCCGGG-3'.

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作った。 ついでこのオリゴスクレオチドアダプター数片を、ロザースタイ ン (Rotherstein) 毎の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジ - (Methods in Enzymol.) 6 B 巻、 9 B 夏 (1 9 7 9 年)) を 用い、1133bp 断片の各末端に結合し、元×1133bp 断 片に存在するBcoRI粘着末端を、Ball粘着末端に転換した。 真核性シミアンカイルス (S'V 4 0) 老蕃本とする発現ペクタ ー、 pKSV-10(NJ、ピスカタウェイ、ファルマシア・フ ァイン・ケミカルズ社)を、制限エンドヌクレアーゼBallによ る消化で組状化した。1133bp のBgl I 適合断片及び、Bgl I 情化ペクターを、TIDNAリガーゼを用いて、激鋒的に結合 し、環状組換えDNA分子 pSV-プレカロTFhを作った。

大縞菌RRIを、 pSVープレトuTFhでトランスホームし、 アンピシリン耐性のトランスホーマントを選択し、クローン化し ご

を、内在する構造遺伝子によりコードされるカロTPh又はプレ huTFhタンパク質の発現するのに適合した実抜性宿主媒件中 に導入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、CRO

宿主を、組役えDNA分子でトランスフェクトし、安定なトラ ンスホーマントを従来法で選択した。例えば、グラハム(Graham) 等、ピロロジー (Virol.) 、 5 2 地、 4 5 6 翼 (1 9 7 3 年) 及びサウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュ ラー・アンド・アプライド・ジェネティクス (J. Hol. Appl. Genet.) 1 巻、 3 2 7 ~ 3 4 1 其 (1 9 8 2 年) 参照。 トランス ホームした宿主細胞を、細胞増殖及びその組織えDNA発現に適 合した条件下で培養し、発現したタンパク賞を、従来法により収 狂した。

a. イーストにおけるプレトロTFhの発現

S. セレビシアエ (cerevisiae) において、プレカuTPh 遺伝子を発現できる組換えDNA分子を、先に述べたように、

5 ' - A A T.T C.C C G G G - 3 ', RU

· 5'' - CGCCCGGG - 3',

の配列をもつオリゴヌクレオチド、アダプター断片を合成し、つ いで例1.6mの1133bp断片の末端に、それを結合すること により排揺した。このようにして作ったアダプター化した断片は、 Clá!粘着未満をもつ。

・イーストの発現ベクター、 pTDT1 (アメリカン・タイプ・ ティシュコレクション、井ATCC31255)を、制限エンド ヌグレアーゼCla i での消化により級状化した。上記のCla i 7 ダプター化1 1 3 3 bp. 断片及び Cla 1 消化ベクターを、 T 4 DNAリガーゼを用いて、線能的に結合し、環状の組換えDNA

分子ョソープレカロTFカを作った。

大陽園RRIをアレトuTPhでトランスホームレ、アレ トuTPh構造遺伝子を発現するトランスポーマントを、例 1 6 cで述べた方法により同定及び選択を行った。

!、イーストにおけるhuTPhの発現

S. セレビシアエ(corevision) において、huTFh 構造 遺伝子を発現できる組織人DNA分子を、pY-ブレhuTFh の Cla!による消化により、第2回の残益1~1135番の区列に対応するヌクレオチド配列を含む1151bp 断片を作ることで排放した。サイズ分類による単額後、1151bp 断片を8bv lで消化し、第2回の残益164~1125番の配列に対応するヌクレオチド配列を含む978bp 断片を作った。この978bp 断片は、サイズ分類により単額した。

5'-CGGACATGTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATT-3',
B ff

3'-CTGTACAGTCCGTGATGTTTATGACACCGTCGTATATTAAATTG-5',

の配列をもつ合成ポリスクレオチドアダプター酸片を作り、先に述べたように、アニールすることで、Cle I 及び Bbv I 粘着末端をもつ DNA アダプターを作った。まず、このアダプター筋片を、978 bp 断片に観鏡的に結合することにより、1020 bp 断片とした。つづいて、この1020 bp 断片を、T4DNAリガーゼを用い、例16 e で述べられているように調製した Cle I 擅化 pTDT1ベクターと結合し、環状組換え DNA分子 pYー buTPbを作った。

組換えDNA分子のYープレカロTFN及びのYーカロTFNを、内在する構造遺伝子によりコードされるカロTFN又はプレカロTFNタンパク質の発現に適合するイースト宿主媒体中に導

17. ポリペプチド p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 9 - 1 6 9による凝集 服客

第7支にそのアミノ酸残益配列を示した例11で送べたように 合成した。

第 7 表

ペプチド名

アミノ政烈荼配列

p 2 4 - 3 5

B - PREPERPUNDUT - OB

p 1 5 9 - 1 6 9

H - ITTLYYHKSSSSGKKTAK - OH

a. 各ポリペプチド実験名は、第1図に含まれているアミノ酸残 本配列を集わしている。

それから、ポリペプチド p2 4 - 35及び p153-189について、例12で述べられているように、huTFによる凝集開始を総合的に阻害する能力を検定した。この研究の結果を第12図に示し、p24-35及び p159-169は、10 mM 温度で用いたとき、各々、huTFで開始した凝集を、45%及び25%阻害できることを示している。この研究において、第12図で白丸により示したこれらペプチドに対する阻害バックグランドは、第4度で示した実験結果よりも低いことに注意しなければならない。結果として、この研究において、10 mM 濃度での凝集阻害を少なくとも20%起こすポリペプチドは、huTF 結合部位ポリペプチド類似物と考えた。

従って、ポリペプチド p 2 4 - 3 5 及び p 1 5 8 - 1 6 9 は本発明の h u T P h ポリペプチド結合部位類似物を示している。 また、ポリペプチド p 2 5 - 4 9 で得られた同様の結果を考慮すると、 p 2 4 - 3 5 で得られた結果は、 h u T F h - 因子ほどほ a 結合部位は、これら 2 つのポリペプチドの共通部分、すなわち、

平成 7.12.20 発行

入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、S. セレビシアエ (cerevisiae) 細胞がある。

宿主細胞を、この組換えDNA分子でトランスホームし、選択 培地で培養して、従来法により、トランスホームした細胞を単離 した。例えば、ハイネン(Binnen) 等プロシーディング・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、75巻、1929頁(1978年)及び、ミヤジマ(Hiyajina)等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 4巻、407頁(1984年)参照。トランスホームした細胞を、細胞増殖及び組換えDNA発現に適合する条件下で培養し、ついでこの発現したタンパク質を従来法で収録した。

g. 組換えねなサドトコード配列の発現による可溶性ななサアト の生産

超換えDNA分子からの可溶性トuTPトの発現は、プレトuTPト及びトuTPトに対し、例16で述べたのと同様に、様々の発現媒体で行なわれた。その例において、BcoR1結着来 鳴を有する断片を含む1133bpのプレトuTPト構造遺伝子の例16aでの作成と、つづいて、例16b-1での操作で、大 隔面、 S. セレビンアエ (cerevisioe) 及びCHO細胞の3種の発現媒体において、プレトuTPト又はトuTPトを発現で含るベクターを作った。関係に、BcoR1結構来鳴を有する可溶性プレトuTFト構造遺伝子を含み、例16aで調製した805bpの断片を例16b~1で述べた方法に従がって操作し、これら同発現媒体中可溶性プレトuTFト又はトuTFトを発現で含る発現ベクター(すなわち、プレトuTFトーTR又はトuTFトーTR)を作った。

第1図で示した残蓄30~35、 (一VNQVYT-) のアミノ 酸残羞配列で作られていることを示していることに注目すべきで ある。

18. 抗カロTF抗体による凝集阻害の速度論

抗 h u T F 抗体が、 h u T F の 森集開始を阻害できる時間を測定するため、この阻害の時間経過を、例 1 0 で述べた限客検定法を用いて測定した。

例 7 で述べたように調製した、MAPS早離化TP8-5G9モノクローナル抗体およそ1 ng.を、100μgHBS/TBS中、例 4 で述べたように期製した再覧質化 h u TPおよそ1 ng と混合した。このように形成した様々の混合物を、37℃で、約1から60分の間の種々の時間維持し、抗 h u TP抗体を、huTPと免疫学的に結合させ、免疫反応重物を作った。第13図で示した時間に、各混合物について、例 2 で述べたように、h u TPの 殺血活性を検定し、ついて、例 10で述べたように阻害率を示した。

第13図で、このような速度論的測定の結果は、この核定で用いた抗体及び特製したhuTFの速度で、65%以上のhuTFによる凝集開始の阻害が、10分以内に起こることを示すことが分る。より高い抗huTF抗体濃度では、より速く、完全な阻害が起こると考えられる。

19. 抗huTF抗体による、huTFによる凝無関始阻害の役与 一応体

抗体投与範囲にわたる、huTF 凝集開始を限客する本発明の抗huTF 抗体の能力は、次の修正をした例で述べた方法により 検定した。例4で調製した再脂質化huTF1nsを、0.1 ps のHBS/BSA中、例7で述べたように単離した、種々の量の TF8-509モノクローナル抗係と混合した。このように調製した複合物を維持して免疫反応虚物を作り、つづいて例10で遊べたように、huTPの軽血活性に関する検定を行った。

そのような役与一応答検定の結果を、第14回に示し、また、このことはこの研究で用いたドロ丁F協皮に対し、 m & 当り、 およも 1 ~ 5 m g の抗 h u T F での最高値の半分の阻害を示している。

同様の投与一応答実験を、hu丁P瀬として溶解したヒト知胞を用いて行なった。

セトの線線穿細胞系列CM1381 (NIGMSヒューマン・ジェネチック・ミュータント・セル・レポジトリー) を、2mMグルタミン、5 Mウシ胎児活性及び抗生物質を捕った、グルベコ修正イーグル培地 (DMEM、NYH、グランドアイランド、ギブコラボラトリー) 中、37でで、7%(v/v) 二酸化炭素空気雰囲気下で培養した。GM1381細胞を増殖し、そして収穫し、さらに30×10・個の細胞のペレットを進心で調製し、一70でで凍結した。この凍結ペレットをHNバッファ (25mMペス、140mM NaC4、pH10) 中の15mMペータ、オクチルグルコピラノンド溶液 3 alを加えて急速に配解し、さらに10分間37でに維持して、細胞を溶解した後、HN18alを加えて、細胞溶解物を作った。

例17で述べたように単離したモノクローナル放体TP8-5G9を、第15回に示した種々の投与に対し、0.01%B5A(シグマ、RIA級)で希釈した。それから各抗体発釈物25μ2に、先に調製した糖胞溶解物225μ2を加え、60分間37でに保って、抗体を細胞溶解物中に存在するカロTPと免疫反応させ、免疫反応菌物を形成させた。その後、25mM CaC4,

ーション混合物 100 μ 4 を、50 μ 4 のヒト因子 17 欠損血漿及び 50 μ 4 の 50 m M C a C 4 1 に添加することにより測定した。 37 で、1分後、相同種の血清の10倍粉釈物 50 μ 4 を因子 14 減として加え、凝血形成時間を2度測定した。

24個のM。Ab のうちの18個がパブーン属下F又は、アフリカ・ミドリザル存尿相論抽出物のプロコアグラント活性を阻害した(第8表)。しかし、M。Ab のいずれも、ラット、ウサギ、子ウシ、イヌ、牟又はブタのTFと、交差反応を示さなかった。すなわち、相図的因子VI河の存在下、ヒト因子VI欠失血漿のリカルシフィケーション時間促進能を示すTF調製物ではなかった。 流体のいずれも、正常なヒト血漿での検定による、ウサギTPのコアグラント活性を示さなかった。 平成 7.12.20 発行

50 μ ε を、免疫反応度物を含む溶液 50 μ ε と混合し、ついで、50 μ ε のクエン酸化ヒト血漿と混合し、凝集を開始させた。 このようにして作った混合物を 37 でに難持し、血法の添加と、凝血形成の間の時間を測定した。効果的 h u T P 経度及び限害率を例 10 に述べたように計算した。

トu TF 疎として、ヒトGM1381相脑溶解物を用いた役与 一応答問客検定からの結果を、第15回に示した。これらの結果 は、TF8-5G9抗hu TF抗体が、 mg 当り、およそ8-10ng の抗体線度で hu TFのこの細胞溶解液の半分の阻害を 経こしたことを示している。

20. 非ヒト組織因子とMGAbの交差反応性

担機因子を、脳組織(ラット、ラピット、子ウシ、イヌ、単、ブタ及びヒヒ)又は、組織培養細胞(アフリカミドリザル胃環(COS)組物)から早難した。組織又は細胞を融解し、膜をはぎ、ミンテし、組織18当り、1m8の冷でセトン中ではそびまった。この固体をアセトンに懸濁し、もう5回減過し、一晩空気乾燥したのち、−30℃で保存した。関始温度量の16~18%を含むアセトン粉末を細かくしてから、5mm0/LEDTを含む TBS中、5%(w/w)となるよう懸濁し、室温で1時間混合した。10.000×8、20では、30分間の違心で固体を集め、ついて下含有膜を100.000×8、1時間の上常の違心で集めた。このペレットを、TBSに無減し、−80℃に保存した。

動物TP(TF活性をもつ組組織抽出物)による抗体照害を、次のように側定した。等容量のTP(1 m/m 2)及びハイブリドーマ上清(TBS/BSAでの10倍帯駅物)を、37でで2時間インキュベートした。残存するTF活性を、そのインキュベ

第 8 表

		RIA	Fob	912	*>1071	阻害	字:	動物
MoAb	アイフタイプ	(cpa)	ブロット	R	×R	强血,	и.	の阻害
TF8-5C4	IzG1. #	6242		±		96		
TF8-569	InGl. *	28587		Ξ.	+	99	57 80	
7F8-11D1:		29453	÷	•	+	99		
	. 1801. *	23455			+	39	82	
TF9-1F1	fg61, #	25133	•	•	+	95	83	n. 3
TF9-105	1 a G 1 . #	3872	. +	+	•	95	76	n. 3
TF9-187	lgG1. #	28586		+	+	97	90	M. 3
TF9-188	IgG1, #	28552	+	+	+	98	83	H. 3
TP9-189	igGl. #	28523	+		+	97	84	H. 3
TF9-2C4	· TeG1. #	24435	+	+	+	97	78	н. 3
TF9-2F5	1461. A	27422	+		+	97	79	H. 3
TP9-4D11	TeG1. #	25994	. +	+	+	97	81	ff. 3
TF9-564	IgG1, #	24073	•	÷	ŧ	97	83	8.8
1F9-5B7	igG1, κ	25819	+	+	+	97	74	n.3
1F9-5C7	iaGl. x	24543	+	+	+	96	72	n.3
TF9-684	1:61, z	17894	+	+	+	96	98-	н.3
TF9-6G4	IEG1. #	24065	+	+	+	95	78	H. 3
TF9-6C9	igGi, z	8054	+ '	+		95	47	
F9-7E10	1#G1. *	8025	•	+	+	97	54	
179-8E3	[gG], ≈	29152	+	•	ŧ	97	76	n.3
F9-9E1	IsG1, #	18169	+	+	·.	90	71	н. 3
P9-9C3	igG1, K	30222	+	+	•	97	82	n.3
F9-984	IgG1, #	33728	+	+	į.	95	82	н. з
F9-10C2	IaG1. #	28692	+	+	4	98 .	71	H.3
P9-10H10	I gG 1. #	24585 .	• +	+	•	0	20-	
A6100	IsG. R	1929			-	0	0 *	

モノクローナル抗体TF8-5G9による、 種々の細胞及び組織の凝血活性の混客

12 . 0 .0 .0 .0 .0 .					
TP恁性源	抗体なし	P 語(生 (% ! DQ	田睿) TFB	-569
特製ヒト脳エF	1569	1520	(3\$)	245	(84%)
粗麗抽出物	2059	2059	(02)	411	(801)
租胎叠抽出物	1287	1344	(02)	159	(882)
GN1381機維穿細胞 (溶解化)	990	965	(23)	143	(861)
ヒト単球 (溶解化)	2893	2745	(52)	178	(94%)
J82 膀胱がん細胞(寝解化)	882	902	(0X)	93	(892)
ウサギのトロンボプラスチン	2106	2108	(01)	2157	(02)

- 特製したヒト脳TFを、テスト前にリピロトビヒクルに再構成した。
- 2. 右の2つの頃は、指示されている物盤!gGで処理した後例 定した、ミリユニットで表わした残留TP语性の2回の平均頃 が示されている。残存するTP活性の測定的、サンプルを37 でで20分間、10μgノ mAの1gGとインキュペートした。 カッコ内の値は、抗体なしの同サンプル活性ユニットに対する 服容率が示されている。
- 21. 因子77結合の研究

因子リノVIaのTPへの結合は、機能性TP:VI/VIa 裁集促 遊復合体の集合に必要とされるので、因子VI/VIaのTPに対す も結合を妨げることによる、第8支に示したMoAbのTP活性 中和能がテストされた。

ヒトの組織因子仲介による、因子VIのJ 8 2 の膀胱がん細胞変面への結合はよく調べられている。フェア(Pair)等、ジャー

1. 特にことわらないかぎり、全ての結果は、ハイブリドーマ組

- 海培養上清の10倍希釈物を用いて得られたものである。毎分

2. 還元 (R) 又は非選元 (NR) のTFを用いて行ったウェス

3。 精製したヒトの筒TFによって誘導されるヒト血漿の凝粧の

4. J82 招助に対する特異的 ***! - 因子VI/VI * 結合の阻害。 5. 組ヒヒ脳治出物 (B) 又は溶解 COS 細胞 (M) により誘導 されるヒト血張凝集阻害。 M o A b が 6 0 %以上の凝血語性を

M o Ab T F 8 - 5 G 9 を用いて詳報に試験した。T P 8 - 5 C

9は、Ⅰ8G環度≥1μ8/8kのときの90%以上、特製再型

愛化したヒトTPの機能を中和する(第18回)。ヒトの細胞溶

解物及び相組機抽出物の凝血活性を阻害する、このM o A b の能

力も示されている(第9表)。10gg/sgのlgG湯度での

TP8-5Ggは、祖賦及び胎盤のアセトン粉末及び溶解したヒ

トの繊維芽細胞、膀胱が心知胞及び内毒素活性化末梢血液単核細

取の凝血活性の80%以上を定量的に阻害する。

阻害するとき、文字がその種の場所に入れられている。 種々のヒト組酌及び組織により発現される級血活性の関客を

1311-TPを用いている。

クンブロット。

照事.

当りのカウント数 (cpm)で扱わされているラジオイムノアッセイの結果は、ラクトパーオキンダーゼを使ってラベルした

」82細胞を12穴培養アレート中、フェア(Fair) 等によ って報告されているように(上述)、集密化するまで培養し、パ 777A (137mM NaCt. 4'mM KCt. lin mol. レーグルコース、 5 mMアジ化ナトリウム、 1 0 ㎡Mへペス、 p H 7.45)で洗浄し、ついで、精製したMoAb IgG又は、 ハイブリドーマ培養上清10倍希釈物を含むパッファA0.7ast とともに、37℃で2時間インキュベートした。塩化カルシウム 及び、 imal - 因子ほノほaを各々、最終減度5mM及びlnM となるよう添加し、さらに37℃、2時間インキュペートした。 その後、お腹阜原を、冷パッファB(1 4 0 mM N m C & 、0.5 %BSA、5mMトリスHC&、 pH 7. 4 5) で5回洗浄し、1 m & Ø 0. 2 M N a O H、1 % S D S、1 0 m M B D T A 溶液中 で溶解し、その溶解物のガンマ線をカウントした。特異的結合は (非ラベル因子VI / VI a を J O O 倍過剰存在下、細胞と会合する | *** | 因子 VI / VI a)、非特異的結合放射活性を差し引いて測定 した。特異的結合の阻害率は9容のバッファAと、1容の特養培 地で処理したコントロール細胞に対する、Mo Ab で処理したJ 82胡散という形で選定した。

因子WノW』がTFに結合したとき、それはうなく取り込まれないが、抗体結合によるTFインターナリゼーションの可能性を 除くため、JB2和胞を、5mMフジ化ナトリウムで代謝的に尋 殺した。初胞のアジド処理の有無にかかわらず聞じ結果が得られ *****.

でこの研究の結果は、上の第8要に示されている。TF活性を阻害する全ての23個のM。Abは、因子VI/VIa結合も阻害した。 予想されるように、TF活性を阻害しないM。Ab、TF9-10H10は、因子VIの結合を阻害しなかった。

22. J82細胞による因子×ョ形成の阻害

J82年贮上でウトロTF:74/74a複合体による因子Xa形 成速度を、次の修正をした、フェア (fair) 等(ジャーナル・ オブ・パイオロジカル・ケミストリー (J. Blot. Chem.) 、 262巻、11692頁(1987年))により報告された、多 穴培養プレート検定法を用い2度定量した。相胞を、12穴プレ ート中で培養し、J82組胎への因子VI/VIa結合の際に上述し たように、検定開始前、種々の濃度の精製した、MoAb のIs C **適分と37セで2時間プレインキュペートした。単一の満度の因** 子 VI /VI a (1 m.M.)を検定で採用した。因子Xを最終濃度50 д g / в 1 となるよう添加した後、 5 、 1 0 、 1 5 分の間隔で、 5 0 p 4 の上流を採取し、5 5 0 p 4 の 5 0 m M トリス・HC 4 、・ 2 2 5 mM'Na C & 、 5 0 mM B D T A (pH 8.2) の溶液中 に入れた。発色性因子Xa莶質添加後(TX州、ビューモント、 ヘレナラプ社、3.4 m M S - 2 2 2 2 5 0 μ M)、速度輪的分 祈モジュールをつけたベックマンD U -30分光器で605nm の吸光度の増加を測定することにより、因子×の活性を定量した。 図子 NI/NI●非存在下でインキュベートしたJ82細胞上滑のS - 2222加水分解によるパックグランドを各側定値から選引い た。抗体処理の阻害率は抗体とのプレインキュペーションなしの 超 腹に対して計算した。

M o A b T F 9 - 2 C 4 及びT P 9 - 5 B 7 による J 8 2 相版

磁行

の処理に対する図書曲線は、因子 X a 形成速度が、因子 Y X 結合を阻害したものと同様の抗体循度で阻害されることを示している(第17回)。非阻害的(非中和性) MoAb TP9~10H10は「g G 過度」0 Pg/mlをで、設血促進活性、因子 Y V V v a 結合又は因子 X a 生成速度にほとんど影響を与えないし、また、コントロール MoAb PAb 100は全く効果がない(デーク示さず)。

23. huTFhポリペプテドの因子U/Waへの競合的結合による、J82相談上での因子X活性化の関本

当分野ではよく知られているように、孤血促進プロテアーゼカ スケードの相談活性化は、消費性血栓出血症と呼ばれる種々の病 気と関連している。一般に、磁血促進プロテアーゼカスケードは、 腱レセプター及び基本的共因子、短期因子 (TF) に対する因子 W/WIの高い親和性による発見により、細胞表面で開始する。 TP及び因子は人で2の二分子森庭促進複合体(TP: W/W2) は、最終的にトロンピン形成及びフィブリンの折出につなかる限 定したタンパク賞分解による因子X及びRの活性化を起こす。さ らに、森血におけるTPの役割、TPによる凝集プロテアーゼカ スケードの開始は、授権性血管内疑固及びトロンポジェネシスと(関連する。ニーメツ (Hismetz)等、ブラッド (810od) 4 2 巻、 . 4 7 頁(1 9 7 3 年)及びベビラクア (Bavilacqua) 等、ジャ ーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Hed.) 、 160毫、618頁 (1984年)。 TFは、炎症性仲介物に対 する応答及び胡鹃性免疫応答で、単球及び内皮細胞の裏面で發現 する重要なエフェクター分子である。

本発明のhuTFAポリペプチドが、因子リノリッに結合し、 それにより、因子Xを活性化することができる、TF:W/Va

・ 第10表 huTPポリペプチドを用いたJB2 神胞に関するX活性化の磁害

•	
カロTFボリペプチド	光学密度
PBS.	0. 9 6 0 ± 0. 0 8 3
因子班/班ョなし	0. 0 0 5 ± 0. 0 0 1
p 1 - 1 8	1. 0 0 7 ± 0. 0 8 7
p 1 - 3 0	1.098±0.028
p i 1 - 2 8	0. 8 8 7 ± 0. 0 7 1
p 2 4 - 3 5 .	0. 4 7 7 ± 0. 0 1 7
p 2 6 - 4 9	0. 4 3 7 ± 0. 0 2 0
p 4 0 - 7 1	0. 8 1 4 ± 0. 0 5 3
p 7 2 - 1 0 4	0. 7 8 1 ± 0. 0 4 7
p 9 4 - 1 2 3	0. 8 1 8 ± 0. 0 5 5
p 1 2 1 - 1 5 5	0. 8 8 9 ± 0. 0 6 7
p 1 4 4 - 1 5 9	0. 5 0 7 ± 0. 0 5 3
p 1 4 6 - 1 5 7	0. 0 0 4 ± 0. 0 0 1
p 1 5 7 - 1 6 9	0. 3 8 9 ± 0. 0 3 \$
p 1 6 I - 1 9 0	0. 6 0 0 ± 0. 0 2 3
p 1 9 0 - 2 0 9	0. 6 2 5 ± 0. 0 3 1
p 2 0 4 - 2 2 5	0: 7 1 5 ± 0. 0 4 2
p 2 4 4 - 2 6 3	0. 6 1 9 ± 0. 0 4 7

もし、光学濃度(O.D.)が約0.500以下なら、因子Xの活性化の阻害は有食であると考えた。

本研究の結果は、huTPhポリペプチドp24-35、p26-49、p144-159、p146-167及びp157-

- 169は、因子47/412に結合し、因子Xを活性化できる、TF
- ; VI / VI = 複合体の形成を阻害することを示している。これらの

複合体の形成を阻害する能力を研究した。

TBS中、100μMのhuTFポリペプチド類似物を含む溶液50マイクロリットル(με)を、96穴平底ポリスチレン検定プレートの各ウェル96個に入れ、ついでその各ウェルに、例3で述べたように単離した、TBS中1のMの速度に調整した因子ほグほとを含む溶液25μεを加え、さらに、TBS中20mMの塩化カルシウム25μεを加え、その混合物を30分間重温に維持した。

ヒト酸脱がん細胞 J 8 2 細胞を、アノリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC HTB1: MD州、ロックビル)から入手し、参考としてここに組込まれているフェア (Pair)等の方法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー)、2 6 2 地、1 1 6 9 2 - 1 1 6 9 8 頁 (1 9 8 7年)) に従って培養した。

50 # # の T B S に 5 × 1 0 ° 個の J B 2 細胞を懸滞し、上述の維持を行った後、ポリスチレン検定プレートの各ウェルに入れた。その後、ただちに、フェア (Fair) 等の報告のように (上述) 単離した、T B S 中 1 0 0 n M の帰度の因子 2 5 p # 及び、X = 発色蒸賞 S - 2 2 2 2 (1 m / m # T B S) 5 0 p # を加え、混合し、その混合物を 2 分間変濃に維持して、発色反応産物を含む複複とした。

生成した発色度物量を、V-max 96 大スペクトロホトメータ (カリホルニア、マウンテン・ビュー、モレキュラー・デバイス 社)を用い、405 ナノメーター (nm) での光学密度 (0.0.)を図定して定量した。ポリペプチドの代りにTBSを用いるか、又は、因子は無添加のコントロールも測定し最高及び最低OD値を決定した。これら阻害の測定結果を第10表に示す。

結果は、本発明のhuTF結合部位ポリペプチド類似物が發着を 観客するのに用いることができることを示している。

24. 抗huTPh MoAb による凝集の生体内での観客 ·

しばしば、グラム階性細菌による腐敗症は、最終的に死に至ら しめるショック状態を起こす。このヘモスタチスシステムの乱れ は、このショック状態の展開と密接に関係している。テイラー (Taylor)等(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. Invest.)79巻、318~825頁 (1987年))は、外的に加えられた活性化した、タンパク質 C、天然の抗凝血酵素、は、凝集応答及びヒヒにおけるLD***。 の大調菌濃度の致命的効果を妨害する。

本発明の抗聚集M o A b の生体内における最無限容能力を、デイラー(Taylor)等(上述)によって報じられた腐敗ショックのととモデルを用いて試験してみた。重さを計った「~8のととを実験前一塊絶太し、実験の朝、ケタミン(筋肉性射、14m/と)で免疫化した。ついで、ペントバルビタール酸ナトリウムを、級皮カテーテルを通し、駅の静脈に投与し、軽いレベルの外科的麻酔状態に維持した(約45分毎2m/上)。大腿部静脈を熱力した(約45分毎2m/上)。大腿部静脈を送込んだ。後皮カテーテルは大腸歯及び例20で示した、MoAbTF9~5B7を含む試剤を与え、ととのTPと交差反応させるのに用いた。30分間の平衡化時間の後、この動物に約10分間にわたって、MoAbTF9~5B7 500μg/kg又は15μg/kg(例7で述べたように単階し、ついで無密生理食塩水に透析し、0.58μg/ma/okb

M O A b 投与及び3 0 分間の平衡化の後、各動物は、L D 100

平成 7.12.20 発行

の大腸面の投与を受けた(約101°個、投与後約8~16時間で 敗血性ショックのため死をもたらす量である)。大腸面は2時間 に渡り往入により投与した。この研究結果を第11歳に示す。

第11表 .

ヒヒの敗血性ショックによる致死の生体内における阻止

グループ	daon	没多	器血,	大路 园住 入	死
1 . 35}0-4	1F9-587	500	Normai	No.	Ho
H., avlo-1	BB*	500	Normal.	Yes	Yes
田、実 数	1P9-5B7	500	Normal	Yes	No
	TF9-587	150	Normai	Yes	No

- 1. 血圧、凝集活性化及びフィブリン分解変物を含む種々のヘモスタチスパラメータは、MoAb 投与後、大陽南往入前に測定した。
- HBは、TP9-5B7と同じ類及び亜額のMoAbであるが、無関係の抗原と免疫反応を起こす。

第11表にみられるとおり、MoAb TP9-5B7を受けた ヒヒはしDise、の大腸菌の役与に対しても生存しつづけた。Hokb 150月8/12及び500月8/12の阿拉与で保護された。さら に、コアグロパシーと関係する、顕著な低血圧、軽質カスケード 活性化およびフィブリンの分解は、MoAb TP9-5B7を受けた動物で楽しく緩和された。

25. ヘモグロビン・アルファ鎮としての、 5 8 kDa h u T P へ テロダイマー経額の特徴

免疫観和性早難したTFをさらにウェスタン・ブロット分析で 特性を調べ、5 8 kD h u T F ヘテロダイマーの成分、すなわち、 例4 で述べた4 7 kDs 及び1 2.5 kDs タンパク質を同定した。

なるという結論を支持している。

使って、現在、例4で述べられている58kDa ヘテロダイマーの125kDa 軽複成分は、ヘモグロビンのアルファ彼であり、47kDa huTFタンパク質との会合は、huTF単離操作のアーテファクトであると考えられている。

併1~25の結果のまとめと討論

2 つの異なる短膨散合体由来の、ヒト間TPに対する、2 4 種のM o Ab ライブラリーについて報じられている。各M o Ab の免疫特異性は、ドットプロット、ウェスタンプロット及びラジオイムノアッセイにより特徴づけられた。 ほとんどのM o Ab は、全ての3条件下、ヒトの本来のTF及び変性TFと反応した。 M o Ab の1つ、TP8-5 G 9 は、TFタンパク質のルーチンな精製にうまく使用することができる。それは組織抽出物由来のTP活性を吸着し、ミリグラム量の精製ヒトTPを一定して与える。

MoAbの1つ以外の全ては、精製したヒト語TFの概範活性を強く中和する。いくつかのMoAbは、ヒヒ及びサルのTFと交差反応をすることが分っているが、相同的因子はの存在下、ラット、ウサギ、子ウン、イヌ、羊、又はブタのトロンボプラスチンにより開始した因子MX展ヒト血機の破棄を、どの抗体も阻害しなかった。さらに、ウサギ脳トロンボプラスチンによる正常なヒト血族の破集開始は、どの抗体によっても阻害を受けず、このことは、ヒトTF暴血活性の阻害は、因子MI/Naを含む、可溶性血性凝血クンパク質への抗体の妨害によるものではないという結論を支持する。

抗TPによるTP嶺血活性の限容に対する最も明解な原因は、因子を/via箱合のブロックである。予想されるとかり、全部で

例6 c で述べたように行った、ウェスタンプロット分析を、電気泳動するサンプルとして、例9 で述べたように調製した、免疫領和性により単難した h u T F、特製したヒトへモグロビン、又は、分子量復歩を用いて行った。指示されているところではジスルフィド結合の選元のため、サンプルバッファの中に50mMジチオスレイトールを含めた。ウェスタンプロットを、非免疫化ウサギI a G、従来の方法で調製したウサギ抗 h u T F I a G 又は、グコ(Daco)(カリホルニア、サンタバーバラ)社から人手したウサギ抗ヒトへモグロビンI a G を用いて、示されているように免疫反応した。最初の2つの1 g G 調製物は、例7で述べたように単難したMAPS-ITある。

上で述べたウェスタンプロット分析の結果は、第18図に示した。抗huTP 1gGは、運元型huTPの47kDaのパンドとのみ免疫反応を起こし、125kDaのパンドとは反応しなかったが(パネル人、レーン3)、一方、同1gGは、非運元型huTPの58kDa及び47kDaの両パンドと免疫反応を起こした(パネル人、レーン4)。これらの結果は、58kDaへテロダイマーの47kDa成分としてのhuTPの同定と一致している。抗へモグロビン1gGは、非運元型huTPサンプル中の58kDaパンドとのみ免疫反応を起こし、47kDaのモノマーとは反応しなかった(パネルB、レーン4)。しかし、抗へモグロビン1gGは、運元型のhuTFサンプル中の125kDaパンドと免疫反応し(パネルB、レーン4)。しかし、抗ヘモグロビン1gGは、プネルとのならではなかった。

上記の結果は、非遺元型huTFの58kDaの分子は、ジスルフィド結合でヘモグロビンと結合した47kDahuTFから

23個の抗数血(中和性)MoAbは、TPの基本的レセプター 機能と一致して、J82相散への因子V/VIaの特異的結合を妨ぐ。さらに、このことは、因子VI結合及び、因子Xa形成速度の 阻害のハーフ・マキシマルが同じ1gG強度のときに起こる、選択した精製MoAbの投与液定においても実証される。

ヒトTFに対するMoAbは、最近、カーソン(Carson) 等 (プラッド (Blood)、 7 0 巻、 4 9 0 頁(1 9 8 7年))によ り、これを直接試験したのではないが、因子VI/VIII 結合の妨害 によることは明白に、TF活性を阻害するものであると帰じられ た。24個のここで述べられているM o Ab のうちの23個が、 TP活性を強く中和するという知見は注目に値する。 彼のヒト聚 '血タンパク質に対するM o A b を用いた当出瑕者の研究室で行っ た実験は、少数の割合のものが機能活性を中和するというもので ある。基本的TPとの交差反応性が含む、反応性が各々異なるこ とから、ハイブリドーマ全てが兄弟クローンであるとは思えない。 さらに、進行中のエピトープマッピング研究は、この種のMoAb に少なくとも3つの別々の非難合抗体結合部位が確認されること を示している。それゆえ、TPに対するM o Ab を中和する大部 分のものは、機能にも関係するわずかな免疫的に優勢なエピトー プによるものでもないらしい;事実、ホブ (Bopp) 等により (モレキュラー・イムノロジー(Hol. Insunol.) 2 0 巻、 4 8 3 貝(1983年)) TFのアミノ酸配列は、多くの抗源活定益を 含んでいることが報告されている。

小さいサイズのTFは、なぜ、そんなに多くの抗TP M o A b が因子甲/VI a 結合をブロックするのかを部分的に説明している。TFは、 c D N A クローニングにより、グルコシル化を除いて、2 5 k D a の細胞升ドメインをもつことが予想されている。それ

ゆえ抗体及び因子なノVI a 分子は、より小さいTFの相脑外Fメインへの結合に立体障害を示しことになる。この立体障害仮説は、TF上の炭化水素質がおそらく機能には必要ないことから(ナカムラ (Froz. Benost.) 5 8 巻、1 3 5 頁(1 9 8 7 年))、コンカナバリーノAはTP活性を阻害する(ピトリック(Pitlick)ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスチゲーション(J. Clin. Invest.) 5 5 巻、1 7 5 頁(1 9 7 5 年))という観察と一致する。

それは、種々の御腔及び組織により発現した因子り依存基直活性は、同様の機能をもつ、1つ以上の分子種に考因するということに、いくらか関連している。しかし、MoAbTP8-5G9は根院及び胎盤抽出物及び溶解した微微芽細胞、膀胱がん細胞及び末梢単核細胞の凝血活性を定置的に限害する。完全ではないが、これらの結果は、現にTFに有因する細胞性凝血活性は、同一ではないときも洗尿的に関連しているという結論を支持している。このことは、TPに対する単一の遺伝子がおそらく存在しているという知見と一致している。

長近、敗血性ショックの政死効果は、凝血プロテアーゼカスケードにおいて、中間段階での役割を果している抗凝血タンパク質、活性化したタンパク質Cを往入することにより、ヒヒにおいて妨ぐことができることが示されている。本研究は、TF浩性を阻害するMoAbは、凝血プロテアーゼカスケードの開始のブロックにより、それらが、血管内凝血の病理学的活性化と退常関連している、血漿凝血因子の病更を妨ぐので、生体内で、非常に特異性の高い抗凝血剤であることを示している。

例4で遠べた58kDa型のAuTFは47kDaのTFタンパク質と、現在では免疫化学的にまた部分的Tミノ酸配列により、

抗TF抗体との反応で観察された。 5 8 k D m パンドの一部を含む、これらマイナーな分子種は、TPと他の未同定タンパク質問で形成された、混合ジスルフィド結合物を示している。

特別の態様及び例を含む先の明報は、本発明の説明を意図した ものであり、これを限定するものではない。多くの他の変化や、 修正が、本発明の精神や範囲を逸散することなく行うことができ る。

平成 7.12.20 発行

へモグロビンのアルファ镇と阿定されている。およそ12.5 kD a のポリペプチドの、ジスルフィド結合で結合しているヘテロダイマーであることが示されている。58kD a のヘテロダイマーが、単葉の途中で形成されているらしいので、58kD a のパンドは、天然の細胞性TFのヘテロダイマー型であるという以前の推案は誤りであるだろう。

ヘモグロビンのプルファ鎖は、1つのシステインをもち、また TFは、 cDNAから、その相路賞ドメインに1つのシステイン を有することが予想される。またT.Pは、細胞外ドメインには 4 個のシステインをもつが、TP糠能が還元により失なわれること から、少なくとも2つが鎮内ジスルフィド結合に使われているは ずである。TPの細胞質ドメイン中の1つのシステインは、ほと んどの細胞質ゾルタンパク質中のシステインのように、運元型で 錠待されているだろう。この(TPの他のシスティンは、ありそ うもない)システインは、細胞溶解後、混合ジスルフィド形成の ため容易にアクセスでき、そして、単離操作間での酸化で、TF . の細胞質及びヘモグロピンのシスティン間でジスルフィド結合が 形成すると提唱される。この結論は、ヘテロダイマー形成は、明 らかに時間依存性があり、脳アセトン粉末由来のTPの昇間活性 刑抽出と、免疫緩和性マトリックスへの結合との間の時間を小さ くすることが、得られるヘテログイマーTF畳を減少させる観察 を支持する。推定される96kDa のTFダイマーも、単離の際 周様のメカニズムで形成するであろう。

次へモグロビン抗体カラムは、3つの5 8 k D a のヘテロダイマーを特異的に結合したが、免疫観和性で搭配したT F 調製物中に観察できる高分子量福全でを定量的に除くことはなかった。
4 7 k D a 以上の分子量をもつ他の底跡量のマイナーバンドは、

請求の範囲

- (1) ヒトの組織因子重領タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わずか約12,000スタレオチド塩基対を含むDNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残益で 表わされるアミノ酸残葢配列を有するタンパク質をコードする、 時次の範囲(1)記載のDNA断片。
- (3) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約918番の 塩基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (2)記載のDNA断片。
- (4) 上記標遺遺伝子が、第1図の約1番から約219番の残器で 表わされるアミノ酸残器配列を有する可溶性とト組織因子量類 タンパク質をコードする、請求の範囲(1)配電のDNA断片。
- (5) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約786番の 塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、構成の範囲 (4)配数のDNA断片。
- (6) 上記第1の配列の5 * 末端に連続し、かつ上記タンパク質のアミノ末端に結合した、アミノ酸機器リーダ配列をコードする第2の配列も含み、かつ該第1及び第2のDNA配列がヒト組織因子重質前駆体タンパク質をコードする混成構造遺伝子を定義する、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (7) 上記提成構造遺伝子が、第1図の約1番から約263署の残器で表わされるアミノ設残器配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(6)記憶のDNA断片。
- (8) 上記環成構造遺伝子が、第2図の約3 (各から約91 8 番の 塩基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、緑水の範囲 (7)記載のDNA断片。

- (9) 上記選成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約219番の残益で表わされるアミノ放残益配列を有する、可容性ヒト組織因子重質タンパク質前駆体をコードする、排水の範囲(6)記載のDNA版片。
- (10)上記湯成構造遺伝子が、第2図の約34番から約786番の 塩基で扱わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (9)記載のDNA断片。
- (11)ヒト組織因子重額タンパク質をコードする構造遺伝子を定義 する第1のDNA断片に機能的に結合したベクターを含む組換 えDNA分子。
- (12)上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の残器で 表わされるアミノ酸残器区列を有するタンパク質をコードする、 持攻の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (13)上記構造遺伝子が、第2図の約130番から約918番の塩 基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (11)配数の組換えDNA分子。
- (14)さらに、上記第1の断片の5、末端に連抜し、かつ上記タンパク質に結合した、アミノ酸残器リーダー配列をコードし、かつ放第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする温成構造進伝子を定義する、建求の範囲(11)記載の超類をDNA分子。
- (15)上記提成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約263番の残器で表わされるアミノ酸残器配列に対応するアミノ酸残器配列を有する、上記タンパク質の前額体をコードする、鏡水の範囲(11)記載の組織えりNA分子。
- (16)上記張成構造遺伝子が、第2回の約34番から約918番の 塩基で表わされるスクレオチド塩基配列に対応するスクレオチ

(25)

H-SGITHIVANYHLIWKSINFKILLEHEPKPV-OH,
H-IKSGDWKSKCFYTIDIECDLIDEIVKDVKQTY-OH,
H-ECDLIDEIVKDVKQTY-OH,
R-LARVFSYPAGHVESTGSAGEPLYENSPEFIPYLC-OH,
H-YENSPEFIPYLETHLGGPFIQSFEQUGTKV-OH, RU
H-ONVIDSRTVNRKSIDSPYC-OH.

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位 ポリペプチド類似物。

(26)a)ヒト組織因子重領タンパク質と免疫反応し、

ь)

R-EFKPVNQVITVQISTKSGDWKSKC-OH,
R-VIGKDLIYTLYYWKSSSSGKKT-OH,
H-SSSGKKTANTINTEFLIDVDKGENYCISV-OH,
H-SGTTNIVAAYHLTWKSTNFKFILEWEPKPV-OH,
H-KSGDWKSKCFYTTDTECDLIDEIVKDVXQTY-OH,
H-KSGDWKSKC-OH,
H-ECDLIDEIVKDVXQTY-OH,
H-LARVFSYPAGNVLETGSAGIPLYENSPEITFYLC-OH,
H-YINSPEFTFYLETNLGPTTQSFEQVCTKV-OH,
H-QAVIPSRTVNRXSTDSPVEC-OH, &U
H-QAVIPSRTVNRXSTDSPVEC-OH, &U

からなる群から選ばれた式で扱わされるポリペプチドと免疫反応し、かつ

- c) 第1図の第204巻から第226巻の部位で示される式 で表わされるポリペプチドと実質的に免疫反応しない、
- 抗体分子を含む、抗体組成物。
- (27)上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲(26)記載の基 成物。

平成 7.12.20 発行

ド塩基配列を有する、情域の範囲(15)記載の組換えDNA分子。

- (17)上記ベクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を指揮 しうる、請求の経題(11)記載の銀旗えDNA分子。
- (18)上記ペクターが、宿主知助中、上記タンパク質を発現しうる、 静攻の話題([1])記載の組換えDNA分子。
- (19)上記ベクターが、宿主細胞中、上記前駆体タンパク質を発現 しうる、鏡水の範囲(14)配数の組換えDNA分子。
- (20)上記ベクターが、pKSV-10であり、かつ、上記選成構造遺伝子が、可得型の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、第2回の34番から786番の塩塩で表わされるスクレオチド記列を有する、糖次の範囲(19)記載の組換えDNA分子。
- (21)わずか約50アミノ改残者を含み、かつ、

- VHOVITYOUST - . BU

- LYYWESSSSERT -

からなる群から選ばれた式で衰わされる配列に対応するアミノ 酸残益を含む、ヒト組織因子結合部位ペプテド環似物。

(22)上記ポリペプチドが、式:

HO — TRIGUTY FORV — B

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(23)上記ポリペプチドが、式:

B - LYYWKSSSSCKKT - OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

(24)

H-EPKPUNQVYTVQISIKSGDMKSKC-OH, H-VFGKDLIYTLYYMKSSSSGKT-OH, &V H-SSSGKKTAKTHTHEFLIDVDKGENYCFSV-OH.

からなる群から選ばれた式で衰わされるヒト組織因子結合部位 ポリペプチド類似物。

- (28)上記抗体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、 球の範囲(26)記載の抗体組成物。
- (29) ヒト組織日子童頃タンパク賞及び第1図の25番から49番の残羞で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する 依分子を歴生する、TF8~5G9と命名されたハイブリド
- (30) 請求の範囲(29) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (31) ヒト組織因子重領タンパク質及び、第1図の第28番から第49番の残益で示される式で変わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TFS-10H10と命名された、ハイブリドーマ。
- (32) 請求の範囲(31) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体 分子を合むモノクローナル抗体級成物。
- (33) ヒト組織因子重換及び、第1回の第146番から第167番 で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分 子を産生する、TP9-6B4と命名した、ハイブリドーマ。・
- (34) 観求の範囲(33) 記載のハイブリドーマにより魔生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (35)。) 身体サンブルを、ヒト組織因子重復タンパク質と複合し、 免疫反応視合物を作る;
 - b)この混合物を、上記銃体がサンプル中に存在するヒト組織 因子と免疫反応し、免疫反応強物を形成するのに十分な時間維持する、そして、
- c)ステップ b) で生成した免疫反応度初の存在を検定する、以上、a) ~ c) のステップを含む、体液サンブル中のヒト組織因子重減タンパク質の存在を検定する方法。

- (36) a) 生理学的に許容しうる希釈剤及び、血栓中に存在するヒト 組織因子と効率よく免疫反応する、生体内指示手段と結合 した、ハイブリドーマプドラー10 H 10 によって度生される、ある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物 を抜け者に静脈投与する。
 - b)上記投与を受けた被検者を、上記抗体分子が、血栓の一部 として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、免疫反応 産物を形成するのに十分な、予め決められた時間維持する; そして、

c)ステップb) で生成した免疫反応魔物の存在を検定する、 以上、a)~c)のステップを含む生体内の血性を検出する方 法

(37) 存在するとト組織因子と効率よく結合する、TP8-509.及びTP9-5B4からなる群から選らんだハイブリドーマによって度生される、ある量の抗体分子を含有する生理学的に許容される特权剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被依体に静脈投与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝血因子M2/M2=への結合能を中和する方法。

(38)組成物中、因子は/ほぁと効率的に結合する量の、

H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKC-OH, H-VYGKGLIYTLYYWKSSSSGKKT-OH, ÆD' H-SSSGKKTAXTNTHEFLIDVDKGENYCFSV-OK...

からなる群から選ばれたポリペプチドを、含有する生理学的に 許容された希釈剤を含むポリペプチド組成物を被役者に静駅投 与することを含む、生体内におけると、ト組織因子の凝血因子VI /VIII への結合を阻害する方法。

(39) a) 肄求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージ

求の範囲(42)記載の組成物。

(45) a) 少なくとも1 回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子経額タンパク質を含まない、生物学的活性のあるヒト組織因子重額タンパク質の水溶液を含有する組成物を含むパッケージ、

を含む血管システム液体サンプル中での憂固能を検定するキットの形をした診断システム。

- (47)上記重領タンパク質がリン脂質中に分散している、諸求の総 圏(46)記載の診断システム。
- (48)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1巻から 第219巻の部位で表わされるアミノ酸残器配列を有する、線 水の範囲(46)記載の体紙システム。
- (49)a) とト級権因子賞領タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ酸残差リーダー配列をコードする第2のDNA断片で、填第1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前駆体をコードする高成構造遺伝子を定しているDNA断片と機能的に結合する、本乳類細胞に適合する発現ベクターを含む組換えDNA分子でトランスホームしたホ乳質細胞の栄養培地での培養を開始する;
 - b)上記培養物を上記細胞が止記組換え DNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そして
 - c)上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する、·
- 以上、a) ~ c) のステップを含む、成熟にト級微因子重視タンパク質の調製方法。

平成 7.12.20 発行

を含むサンプル中に存在するヒト組織因子重援タンパク質の存在を検定するための、キットの形をした診断システム。

- (40)上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、
 - a) TF8-5G9.
 - b) TF9-6B4.
 - c) TF9-10H10

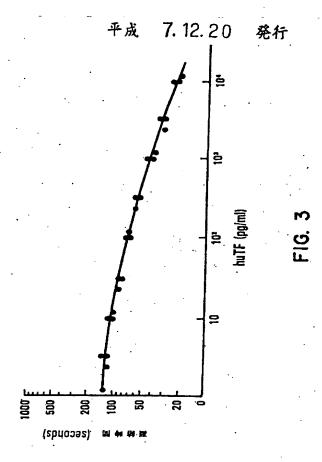
からなる舞から選ばれたハイブリドーマにより産生される、精 求の超屈(39)記載の診断システム。

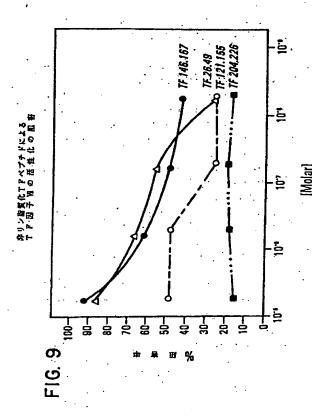
- (41) a) サンプルを、固体マトリックスに固定した、静攻の範囲 (15) 記載のポリペプチドを含む固体サポートと混合し、結 合反応混合物とする、
 - b)上記結合反応複合物を、上記級血因子が上記ポリペプチ ドと結合し、固相複合体及び上滑を形成するのに十分な時 間維持する。
 - c)上記複合体から上記上波を分離する、及び
 - d) ステップ c) の分離した複合体から、上記嚢血因子を回収する、

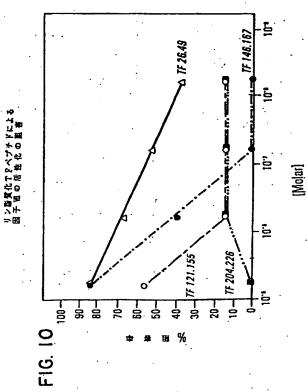
以上、a)~d)のステップを含む、サンブルから血液最固因子VI/VIaを単離する方法。

- (42)実質的に、ヒト組織因子軽額タンパク質を含まない生理学的 活性のあるヒト組織因子重額タンパク質の水溶液を含む組成物。
- (43)上記生物学的活性のあるヒト組織因子重額タンパク質を、リン肪質中に分散させた、建议の額頭(42)記載の組成物。
- (44)上記溶液が、非イオン性界面密性剤を含む、請求の範囲(42) 記載の銀成物。
- (45)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から 第219者の部位で表わされるアミノ酸残器配列を有する、請
- (50)上記混成構造遺伝子が、第2図の第34番から第786番の 塩基で衰わされるスクレオチド塩蒸配列を有する、請求の範囲 (44)記数の方法。
- (51) 請求の範囲(49)記載の方法により産生した、成熟ヒト組織因子宣旗タンパク質を基本的に含む組成物。
- (52) 請求の範囲(50) 記載の方法により産生した成熟ヒト組織因子 重調タンパク質を基本的に含む組成物。
- (53) バイブリドーマTFB ¬ 5 G 9 により産生される抗体分子を、 投与時間内に存在するヒト組織因子と効率よく結合できる量含 有する、生理学的に許容された希釈剤を含む、モノクローナル 抗体組成物を、被被者に静原規与することを含む、ヒト組織因 子の、総息団地能を中和する方法。
- (54)ヒト組織因子重額タンパク質及び、第1図の第25番から第49番の残害で示される式で表わされるポリペプチドと角接及 応する坑体分子を度生する、TF9-5B7と命名されたハイブリドーマ。
- (55) 請求の範囲(54) 記載のハイブリドーマにより重生される抗体 分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (56) ハイブリドーマTP9-5B1により産生される抗体分子を 合有する生理学的に許容された希釈剤を含む治療に効果的な量 のモノクローナル抗体組成物を、被検者に投与することを含む、 ヒト組織因子の森血南始能を中和する方法。
- (S7)a) ヒト組織因子重領タンパク質と免疫反応し、それにより、 銃タンパク質の因子別/VIaへの結合能を図客し、かつ
 - b) h u T F h : W / Y a 複合体と免疫反応し、それにより、 紡複合体の因子 X 活性化能を阻容する抗体分子を含む物療 的に効果的量の、抗凝血モノクローナル抗体組成物を投与

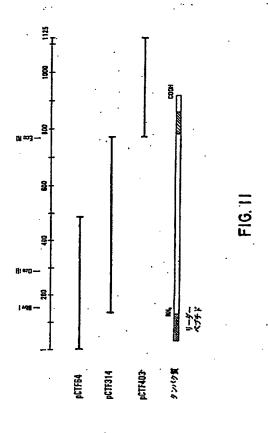
することを含む設血を粗容する方法。 (58)上記収体分子がさらに、ヒヒ組織因子と免疫反応を起こすことを特徴とする、確求の範囲(57)記載の方法。

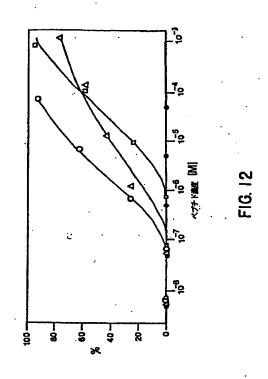


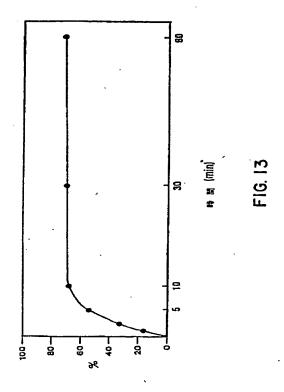


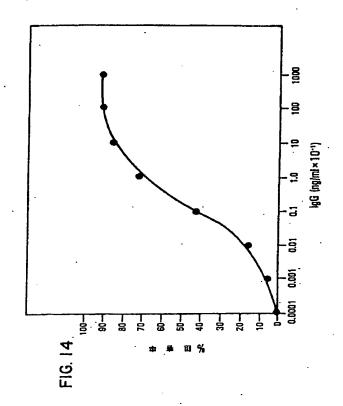


-.568--40-









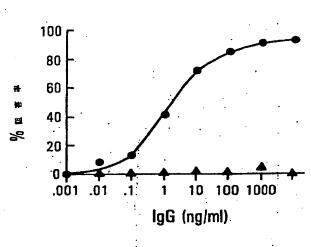
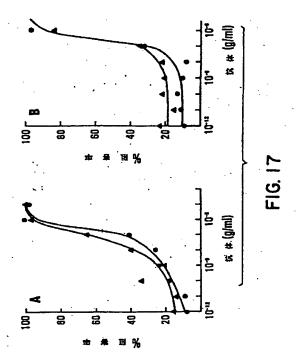


FIG. 16



THIS PAGE BLANK (USPTO)